



**Joana Nobre Pinheiro Efeitos Ecotoxicológicos das escorrências
superficiais em zonas ardidas**



Joana Nobre Pinheiro Efeitos ecotoxicológicos das escorrências superficiais em zonas ardidas

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia do Ambiente, realizada sob a orientação científica do Doutor Jan Jacob Keizer, Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro, e do Doutor Nelson José de Cabaços Abrantes, estagiário de Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro.

A dúvida é o princípio da sabedoria.

Aristóteles

o júri

presidente

Doutora Maria Helena Gomes de Almeida Gonçalves Nadais

Professora Auxiliar do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Doutora Catarina Pires Ribeiro Ramos Marques

Estagiária Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Doutor Jan Jacob Keizer

Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro.

Doutor Nelson José de Cabaços Abrantes

Estagiário de Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro.

agradecimentos

Em primeiro lugar aos meus orientadores, Doutor Jan Jacob Keizer e sobretudo ao Doutor Nelson José de Cabaços Abrantes pela forma como me acompanharam e orientaram, pelos conselhos, encorajamento e motivação sem os quais nunca teria sido possível concluir esta dissertação.

Agradeço ao Professor Doutor professor Fernando Gonçalves e a todos os que trabalham no laboratório LEADER do Departamento de Biologia, por me terem acolhido nas instalações, por todos os conselhos dados, sem eles a realização da componente ecotoxicológica nunca poderia ter sido realizada.

Agradeço aos meus pais por me terem trazido ao Mundo. À minha irmã por ser a pessoa mais especial. Às “minhas” meninas (Ângela Rito, Bruna Oliveira, Elsa Sá, Juliana Monteiro) por terem partilhado estes anos comigo e me terem mostrado a MAGIA da Vida. Ao Rui por me ensinar que o mais importante é sorrir e por tudo. Aos meus amigos e amigas, adoro-vos. Aos amigos dos últimos anos, por me fazerem rir, pelos jantares e por toda a paciência que tiveram. A todas as pessoas que marcaram o meu caminho. Aos meus avós um muito obrigado sem eles era impossível estar aqui. Em especial ao meu avô Zé Manel, saudades.

palavras-chave

Incêndios florestais; hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; ecossistemas aquáticos; ensaios ecotoxicológicos.

resumo

Os incêndios florestais produzem elevadas quantidades de Hidrocarbonetos Aromáticos policíclicos (HAPs), conhecidos pela sua potencial toxicidade e persistência ambiental. Através de vários sistemas de transporte, nomeadamente escoamentos superficiais, os HAPs provenientes de zonas ardidas entram nos sistemas aquáticos podendo comportar riscos para o ecossistema e saúde humana. Neste sentido, a presente dissertação teve como objectivo central a avaliação da potencial toxicidade das escoamentos superficiais provenientes de zonas ardidas em espécies aquáticas, através da realização de ensaios ecotoxicológicos. Em colaboração com o projecto EROSFIRE-II foi seleccionada como área de estudo uma zona ardida em Setembro de 2009 localizada em Sever do Vouga. Foram seleccionadas duas encostas (L e R) nas quais se recolheram amostras de escoamentos superficiais de água. Foi ainda recolhida uma amostra de água num curso de água localizado entre as duas encostas (S). Em laboratório foi efectuada uma caracterização físico-química das várias amostras, incluindo a medição de vários parâmetros, tais como: pH, condutividade eléctrica, oxigénio dissolvido, sólidos totais, nitratos, nitritos, orto-fosfatos, amónia, dureza e sulfatos. Procedeu-se ainda à análise dos 16 HAPs prioritários, definidos pela US EPA. No geral, os vários parâmetros básicos medidos, assim como os nutrientes apresentaram-se relativamente semelhantes nas 3 amostras. Em relação aos HAPs observou-se uma clara diferença entre as amostras L e R e a amostra S, com valores superiores registados nas encostas. Deste modo, os resultados obtidos mostram largamente a importância dos incêndios florestais como fonte de HAPs para o ambiente aquático. Paralelamente foi efectuada uma avaliação ecotoxicológica das amostras que envolveu uma bateria de ensaios com diferentes organismos, incluindo: a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, a macrófita *Lemna minor* e o cladóceros *Daphnia magna*. Os resultados obtidos revelaram efeitos distintos nas várias espécies. Salienta-se a elevada toxicidade que a amostra S apresentou para *V. fischeri* com um EC_{50} de 8% (5min) e 12% (15min). As amostras L e R quer filtradas quer não filtradas, ao contrário da amostra S, provocaram efeitos na taxa de crescimento de *P. subcapitata* nas concentrações mais elevadas. A espécie *L. minor* foi altamente sensível à amostra R não filtrada, apresentando um LOEC correspondente à concentração de 12,5%. Por fim, o organismo *D. magna* apresentou elevada mortalidade ao longo do ensaio nas concentrações mais elevadas, tendo-se observado igualmente uma diminuição significativa na taxa de crescimento intrínseco, em ambas as amostras testadas (S e R) filtradas e não filtradas. De um modo geral, apesar das limitações associadas, os ensaios ecotoxicológicos realizados revelaram os riscos para o biota aquático associados à ocorrência de incêndios florestais e consequente produção de substâncias tóxicas (e.g HAPs). Neste sentido, este estudo salienta a importância de aprofundar os conhecimentos de investigação nesta temática de forma a colmatar a falta de informação relativa a um problema ambiental de elevada relevância.

keywords

Forest fires; polycyclic aromatic hydrocarbons; aquatic systems; ecotoxicological tests.

abstract

Forest fires produce large amounts of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), known by its potential toxicity and environmental persistence. Through various transport systems, including runoff. Superficially, the PAHs from entering the burnt areas aquatic systems can pose risks to the ecosystem and human health. In this sense, this dissertation was central objective evaluation of the potential toxicity of surface runoff from areas burned in aquatic species by testing Ecotoxicology. In collaboration with the project EROSFIRE-II was selected as study area an area burnt in September 2009 located in Sever do Vouga. We selected two slopes (L and R) in which samples were collected surface water runoff. Was also collected a sample water in a watercourse located between two slopes (S). In laboratory characterization was carried out physical chemistry of the various samples, including the measurement of various parameters such as pH, electrical conductivity, dissolved oxygen, total solids, nitrates, nitrites, ortho-phosphates, ammonia, hardness, and sulfates. There has yet to Analysis of 16 priority PAHs, defined by U.S. EPA. In generally, several basic parameters measured and the nutrients were relatively similar in the three samples. Regarding PAHs observed a clear difference between samples and sample L and R S, with higher values recorded on the slopes. Thus, the results show broadly the importance of forest fires as source of PAHs to the aquatic environment. In a parallel carried out an ecotoxicological assessment of the samples involved a battery of tests in different organisms, including: the bacterium *Vibrio fischeri*, the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, the macrophyte *Lemna minor* and cladoceran *Daphnia magna*. The results revealed distinct effects in various species. We emphasize the high toxicity showed that the sample S to *V. fischeri* with a EC50 of 8% (5min) and 12% (15min). Samples L and R both filtered or unfiltered, unlike the sample S, caused effects on the growth rate of *P. subcapitata* in higher concentrations. The species *L. minor* was highly sensitive to sample R unfiltered, with a LOEC a concentration of 12.5%. Finally, the body *D.magna* showed high mortality over the test higher concentrations and it was also observed a significant decrease in the intrinsic growth rate in both samples tested (S and R) filtered and unfiltered. In general, despite the constraints, the tests Ecotoxicological carried out revealed the risks to the biota water associated with the occurrence of forest fires and consequent production of toxic substances (eg PAHs). In this sense, this study highlights the importance of deepening the research knowledge in this subject in order to address the lack of information on an environmental problem high relevance.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Incêndios florestais	1
1.2	Problemática ambiental.....	4
1.3	Ensaio ecotoxicológico	8
1.3.1	Organismos teste.....	9
1.3.1.1	<i>Vibrio fischeri</i>	10
1.3.1.2	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	11
1.3.1.3	<i>Lemna minor</i>	12
1.3.1.4	<i>Daphnia magna</i>	13
1.4	Objetivos.....	15
1.5	Estrutura da dissertação	15
2	Material e métodos	17
2.1	Área de estudo	17
2.2	Locais de amostragem.....	18
2.3	Amostragem.....	20
2.3.1	Procedimentos de colheita de amostras.....	20
2.4	Métodos analíticos.....	21
2.4.1	Parâmetros físico-químicos	21
2.5	Testes ecotoxicológicos.....	23
2.5.1	Teste de inibição de luminescência com <i>Vibrio fischeri</i>	23
2.5.2	Teste de inibição de crescimento com <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	24
2.5.3	Teste de inibição de crescimento com <i>Lemna minor</i>	25
2.5.4	Teste de reprodução com <i>Daphnia magna</i>	27
2.6	Análise estatística	29
3	Resultados e discussão	31
3.1	Parâmetros físico-químicos	31
3.2	Parâmetros ecotoxicológicos.....	37
3.2.1	Ensaio com <i>Vibrio fischeri</i>	37
3.2.2	Ensaio com <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	39
3.2.3	Ensaio com <i>Lemna minor</i>	41
3.2.4	Ensaio com <i>Daphnia magna</i>	44

4	Conclusões e considerações finais	49
	Referências	53

Índice de Figuras

Figura 1- Distribuição anual do número de ocorrências e área ardida (Fonte: ANF 2010).	3
Figura 2- Sazonalidade das ocorrências, fogachos e incêndios, em 2009 (Fonte: AFN 2010).	4
Figura 3- Interações entre o fogo, o clima, a geomorfologia, a hidrologia e a vegetação (Adaptada: Dwire e Kauffman 2003).	5
Figura 4- Parâmetros necessários para um estudo ecotoxicológico (Adaptada: Rubinger 2009).	9
Figura 5- a) <i>Vibrio fischeri</i> (Fonte: http://www.pnas.org). b) Imagem de colónia de <i>Vibrio fischeri</i> luninescente (Fonte: http://pikaia.wordpress.com).	11
Figura 6- a) Imagem ao microscópio de <i>P. subcapitata</i> (Fonte: http://www.shigen.nig.ac.jp/).	12
Figura 7- a) Imagem real de <i>L. minor</i> (fonte: http://www.akvarij.net/). b) Representação esquemática de <i>L. minor</i> (fonte: http://www.mobot.org/).	13
Figura 8- Exemplo de uma cadeia alimentar com a <i>Daphnia</i> no papel de intermediário energético (fonte: http://pulgadagua.blogs.sapo.pt/).	14
Figura 9- Figura representativa de <i>D. magna</i> (Fonte: http://www.mblaquaculture.com/).	14
Figura 10- Localização da área de estudo no Distrito de Aveiro (Fonte: http://www.pcp.pt/).	18
Figura 11- Mapa da localização do incêndio florestal na área de estudo (Fonte: Google maps).	19
Figura 12- a) Posicionamento de uma O.P. na área de estudo. b) Saída das mangueiras onde se ligam os respectivos bidões.	21
Figura 13- Representação esquemática da anatomia de <i>D. magna</i> (Fonte: http://7daphnia.blogs.sapo.pt/).	28
Figura 14 -Inibição de luminescência para <i>V. fischeri</i> para as diferentes amostras filtradas e não filtradas.	38
Figura 15- Taxa de crescimento (dias ⁻¹) determinada para <i>P. subcapitata</i> quando exposta às diferentes amostras filtradas e não filtradas. As barras de erro indicam o erro padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controlo ($p < 0.05$).	40
Figura 16- Taxa de crescimento (dias ⁻¹) determinada para <i>L. minor</i> quando exposta às diferentes amostras no filtrado e no não filtrado. As barras de erro indicam o erro padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controlo ($p < 0.05$).	43
Figura 17- Taxa de crescimento diário, TCD (dias ⁻¹) e Taxa de crescimento intrínseco, r (dias ⁻¹), determinada para <i>D. magna</i> quando exposta às amostras R e S. As barras de erro indicam o erro padrão e os asteriscos indicam diferenças significativas entre as concentrações de cada amostra e o controlo ($p < 0.05$).	46
Figura 18- Mortalidade registada nas diferentes concentrações.	47

Índice de Tabelas

Tabela 1- Número de ocorrências e área ardida em Portugal desde 1 de Janeiro de 2000 até 15 de Junho de 2010. (Fonte: ANF 2010).....	2
Tabela 2- Pontos de amostragem.....	19
Tabela 3- Parâmetros básicos determinados nas amostras de escoamentos (L e R) e na amostra do curso de água (S).....	32
Tabela 4- Nutrientes determinados nas amostras de escoamentos (L e R) e na amostra do curso de água (S).....	34
Tabela 5- Valores de HAPs (ng/L) medidos na parte particulada e na parte dissolvida das amostras de escoamentos superficiais (L e R) e da amostra de água colhidas no curso de água (S).	35
Tabela 6- Síntese dos valores de EC ₅₀ em percentagem de amostra para 95% de confiança para a inibição de luminescência de <i>V. fischeri</i> , aos 5 e 15 minutos.....	38
Tabela 7- Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento (dias ⁻¹) de <i>P. subcapitata</i> e valores de NOEC e LOEC obtidos.....	41
Tabela 8- Resumo do teste t de student de comparação das taxas de crescimento (dia ⁻¹) de <i>P. subcapitata</i> entre a concentração de 100% e 100% com adição de nutrientes.	41
Tabela 9- Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento (dias ⁻¹) de <i>L. minor</i> e valores de NOEC e LOEC obtidos.	43
Tabela 10- Resumo do teste t de student de comparação das taxas de crescimento (dias ⁻¹) de <i>L. minor</i> entre a concentração de 100% e 100% com adição de nutrientes.	44
Tabela 11- Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) e valores de NOEC e LOEC relativos à taxa de crescimento diário (TCD; dias ⁻¹) e taxa de crescimento intrínseco (r; dias ⁻¹) de <i>D. magna</i>	47
Tabela 12- Resumo do teste de U de Mann Whitney de comparação das taxas de crescimento diário (dias ⁻¹) e taxas de crescimento intrínseco (dias ⁻¹) de <i>D. magna</i> entre a concentração de 100%Filtrada e 100%Não filtrada.....	47
Tabela 13- Tabela resumo de resultados para as espécies <i>V. fischeri</i> , <i>P. subcapitata</i> , <i>L. minor</i> , com as amostras L, R e S.	51
Tabela 14- Tabela resumo de resultados para a espécie <i>D. magna</i> com as amostras R e S.	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 INCÊNDIOS FLORESTAIS

Os incêndios são ocorrências de fogo não controlado que podem ocorrer em qualquer local desde que haja material combustível. Em todo o mundo as florestas são devastadas por incêndios que destroem os ecossistemas que delas dependem. Os incêndios florestais podem ter causas naturais, como relâmpagos e vulcões, ou resultarem da acção humana, sendo esta última causa de grande relevo, pelo elevado número de incêndios provocados. Para além dos prejuízos económicos e ambientais, os incêndios florestais constituem uma fonte de perigo para populações e bens (Shakesby e Doerr 2006).

A região Mediterrânica é largamente afectada pelos incêndios florestais, pois tem condições propícias para a ocorrência de tal facto. É uma região de temperaturas elevadas no Verão, variabilidade inter-anual de precipitação, abundância de vegetação arbustiva, abandono de sistemas tradicionais de exploração da terra e seu inadequado uso, o que leva a que o risco de incêndio seja maior (Laranjeira e Leitão 2008). Países Mediterrânicos como Espanha, Portugal, França, Itália e Grécia são os estados membros da União Europeia com maior índice de risco de propagação de incêndios florestais e onde se registam as maiores perdas de área florestal ardida. No ano de 2008, nestes 5 países arderam 158.621 hectares num total de 36 192 ocorrências (Camia et al. 2009).

Relativamente a Portugal no ano de 2008 a área ardida foi de 17.244ha, aumentando para 86.674ha em 2009 (Tabela 1; ANF 2010). Desde 2005 que a área ardida não era elevada. O número de ocorrências decresceu de 2005 até 2008 aumentando em 2009 para um total de 26 115 que ocorrências (Tabela 1).

Tabela 1- Número de ocorrências e área ardida em Portugal desde 1 de Janeiro de 2000 até 15 de Junho de 2010. (Fonte: ANF 2010).

Anos	Ocorrências			Área ardida (hectares)				
	Incêndios Florestais	Fogachos (Área <1ha)	Total	1Jan – 31Dez	Povoamentos	Matos	Total	1Jan – 31Dez
2000	1.351	4.339	5.690	34.109	8.765	7.542	16.307	159.604
2001	594	2.449	3.043	26.942	1.329	1.548	2.877	112.166
2002	1.113	3.795	4.908	26.492	2.237	3.012	5.249	124.409
2003	930	3.937	4.867	26.195	3.937	2.479	6.416	425.726
2004	1.077	3.971	5.048	21.970	5.195	3.163	8.358	129.539
2005	2.533	8.156	10.689	35.698	9.596	10.999	20.595	338.262
2006	800	4.249	5.049	19.921	4.677	3.713	8.390	75.509
2007	335	2.582	2.917	18.732	445	824	1.269	31.450
2008	855	3.139	3.994	13.832	1.236	3.069	4.305	17.244
2009	2.194	5.870	8.064	26.115	5.566	13.675	19.241	86.674
Média 2000-2009	1.178	4.249	5.427	25.001	4.298	5.002	9.301	150.058
Objectivo do PNDFCI para 2012 – média/ano*								<100.000

A figura 1 dá uma ideia geral do número de ocorrências e da área ardida. É bem notório o facto de no ano de 2005 o número de ocorrências ter sido o maior dos últimos 10 anos a seguir ao ano de 2000, mas foi em 2003 que ardeu maior área por hectare (Figura 1). O histórico, entre 2000 e 2009, do total de ocorrências e área ardida, mostra que em 2009 o total registado em número de ocorrências é um pouco superior à média dos últimos dez anos. Relativamente à área ardida, em 2009 arderam menos 63.384ha que a média de 2000 a 2009.

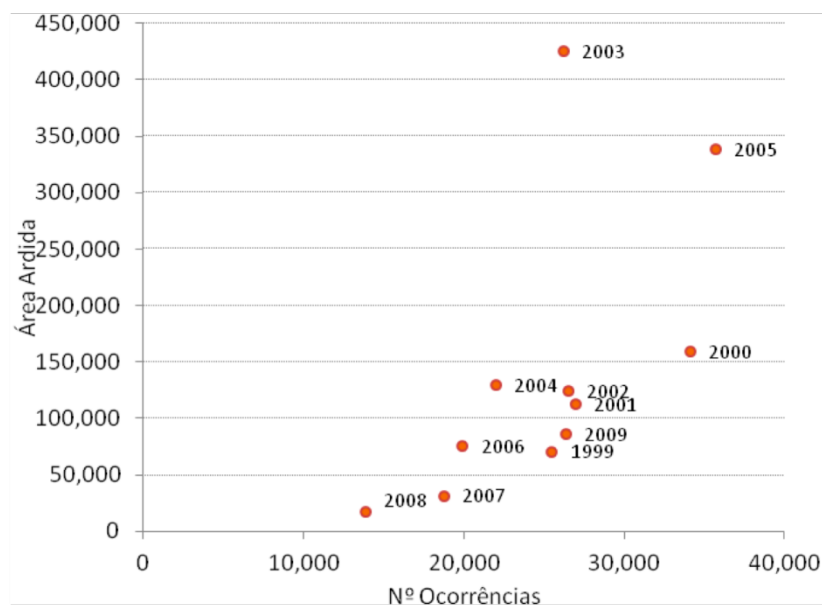


Figura 1- Distribuição anual do número de ocorrências e área ardida (Fonte: ANF 2010).

A distribuição temporal dos incêndios florestais em Portugal Continental é marcadamente sazonal, verificando-se o maior número de ocorrências e de área ardida nos meses de Julho, Agosto e Setembro. De acordo com a base de dados da Direcção-Geral dos Recursos Florestais (DGRF) relativa ao período 1990-2004, os meses de Junho, Julho, Agosto e Setembro representam, no seu conjunto, 80% do número de ocorrências. A área ardida nos meses de Inverno não é muito significativa, comparativamente ao resto do ano (AFN 2010). No entanto no ano de 2009 (Figura 2) o maior número de ocorrências deu-se nos meses de Março, Agosto e Setembro. O mês de Setembro tem registado nos últimos anos um número de ocorrências e de área ardida significativo. Em 2009, Setembro não foi excepção. Esta realidade está provavelmente associada a comportamentos negligentes, relativos ao uso do fogo e a condições meteorológicas propícias à eclosão e propagação dos incêndios. De acordo com o Instituto de Meteorologia Portugal (IM, I.P.) o ano de 2009 foi classificado com um ano normal a seco em todo o território e afirmou-se como o 3º ano consecutivo com valores de precipitação inferiores aos valores médios. De salientar que a Primavera de 2009 foi a mais seca desde 1931. Portugal continental atravessou uma situação de seca meteorológica no período compreendido entre Março e Outubro (IM, I.P. 2010).

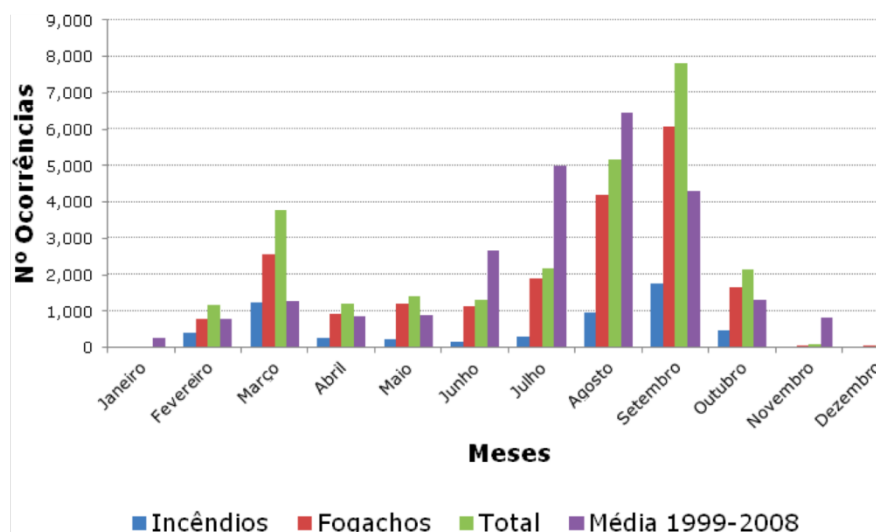


Figura 2- Sazonalidade das ocorrências, fogachos e incêndios, em 2009 (Fonte: AFN 2010).

Dado que, os espaços florestais ocupam dois terços do território continental correspondendo a 5,4 milhões hectares, dos quais 3,4 milhões estão arborizados (dados do Inventário Florestal Nacional de 1995-1998), que a floresta portuguesa produz diversos produtos que contribuem para gerar PIB e postos de trabalho e que cada vez mais estes espaços são devastados por incêndios florestais (voluntários e involuntários), há que conhecer melhor os efeitos que estes fogos têm nos ambientes terrestres e aquáticos (Instituto Superior de Agronomia 2005).

1.2 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL

Os incêndios têm consequências graves nas componentes bióticas e abiótica dos ecossistemas, podendo ser drásticos, já que constituem uma ruptura dos ciclos e cadeias que deles fazem parte. A Figura 3 representa a interacção entre o fogo, o clima, a vegetação, a hidrologia, a geomorfologia e a maneira como estas estão interdependentes entre si. Sabe-se que os incêndios, através dos seus efeitos directos nas propriedades do solo bem como também na cobertura vegetal, podem induzir mudanças consideráveis nos processos tanto geomorfológicos como hidrológicos, nomeadamente ao nível da alteração

da estabilidade do solo, da porosidade da matéria orgânica e das características da repelência da água (Shakesby e Doerr 2006).

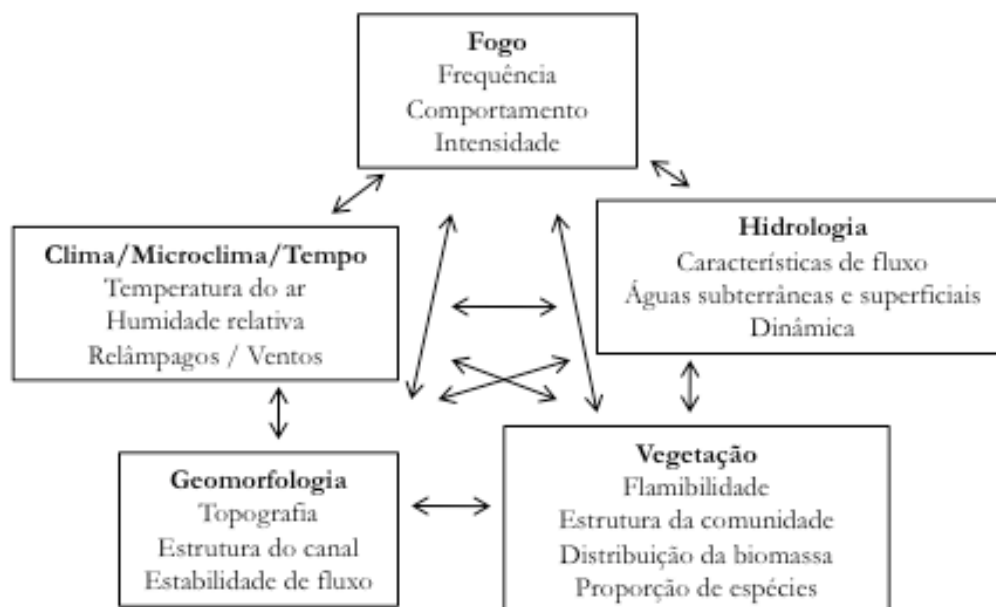


Figura 3- Interações entre o fogo, o clima, a geomorfologia, a hidrologia e a vegetação (Adaptada: Dwire e Kauffman 2003).

A variação do clima traz alterações na distribuição das comunidades e nas características dos incêndios florestais. A dimensão e a gravidade dos incêndios estão directamente relacionados com as variáveis físicas e climáticas, que influenciam a propagação e intensidade do fogo. Com o aquecimento global, os episódios de seca tornam-se mais frequentes, a humidade relativa do ar decresce, o que condiciona o teor de humidade dos combustíveis, e a probabilidade da ocorrência de fogos aumenta, bem como a sua severidade e intensidade (Bisson et al. 2003). Pode-se dizer que as alterações climáticas podem ser a causa do fogo, mas por outro lado, o fogo afecta as alterações climáticas, pois a ocorrência de incêndios florestais lança para a atmosfera gases com efeito de estufa (CO_2 , N_2O e CH_4), perturba o ciclo global do carbono e destrói processos físicos e biológicos.

Após um incêndio florestal, a alteração do coberto vegetal e da camada superior do solo tem um impacto nas quantidades de água envolvidas nos processos do ciclo

hidrológico. A evapotranspiração é reduzida devido à diminuição da actividade do coberto vegetal, a erosão dos solos é potenciada, a capacidade de infiltração de água no solo é diminuída e os excedentes hídricos superficiais aumentam.

Quando ocorre um incêndio florestal o solo é aquecido a 270-400 °C e o oxigénio disponível é queimado o que reduz a estabilidade da estrutura do solo. As alterações no solo dependem do tipo de solo e das temperaturas que chegam ao solo durante a queima. Em alguns solos, o calor gerado durante um incêndio produz uma nova agregação de partículas por recristalização dos óxidos de Fe (ferro) e Al (alumínio). É durante a queima que substâncias orgânicas hidrofóbicas se volatilizam, criando um gradiente de pressão na camada aquecida, o que faz com que algum material se escape para a atmosfera e outro desça para o solo, onde ocorre condensação nas partes mais frias ou abaixo da superfície do solo (Shakesby e Doerr 2006).

Os fogos não têm só impacto na variação do clima ou nos solos, mas afectam também a qualidade da água e consequentemente os organismos que nela habitam, tais como algas, peixes e micro e macro invertebrados. Indirectamente prejudicam os processos de criação e subsistência dos sistemas aquáticos, visto que alteram características, temperatura, fluxo e a capacidade de produção destes. O impacto dos incêndios depende da intensidade e da duração dos fogos. Os efeitos a curto termo também dependem dos eventos de chuva após o incêndio, isto porque é significativa a influência da precipitação na distribuição dos nutrientes e dos diferentes elementos (cinzas). De acordo com Ferreira et al (2004), as cinzas produzidas pelos fogos são constituídas por substâncias poluentes, como metais pesados, nitritos e outros produtos orgânicos, tais como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Estas substâncias poluentes contaminam o ambiente (ar, solo e água) e podem ter um impacto na cadeia alimentar e manutenção dos seres vivos. As cinzas são transportadas como poluentes de escoamento de água à superfície ou são lixiviadas por águas de infiltração no solo e que mais tarde recarregam as águas subterrâneas (Ferreira et al. 2004). Nas águas superficiais os HAPs podem sofrer oxidação, fotodegradação, biodegradação, ligando-se a partículas ou a acumularem-se nos organismos. No solo os HAPs podem ser biodegradados, acumularem-se nas plantas ou podem penetrar na água subterrânea e serem transportados para os aquíferos, contaminando-os.

Como referido, os incêndios florestais produzem HAPs conhecidos pela sua potencial toxicidade e persistência ambiental. Estes podem ser sintetizados naturalmente ou

formados pela combustão incompleta a alta temperatura ou em condições deficientes em oxigénio, alguns são altamente prejudiciais para a saúde humana. Dai que a identificação e quantificação dos HAPs seja de extrema importância a nível ambiental, já que estes ficam adsorvidos às partículas de cinzas e folhas de plantas que são um importante meio de transporte de poluentes orgânicos para os sistemas aquáticos. Os HAPs são compostos constituídos por dois ou mais anéis formados por átomos de carbono e hidrogénio ligados entre si, podendo ter ou não grupos constituintes. A fórmula molecular dita as suas características, tanto ao nível da solubilidade, da degradação e da pressão de vapor. Têm geralmente baixa solubilidade em água o que quer dizer que permanecem nela durante algum tempo e são facilmente adsorvidos pelo solo devido às suas propriedades hidrofóbicas. Os HAPs são muito resistentes à degradação, devido à sua estrutura com anel complexo, podem ser rapidamente metabolizados por alguns organismos, resultando muitas vezes em efeitos tóxicos, outros organismos porém, não conseguem metabolizar esses compostos, bioacumulando-os. Também podem ser degradados quando expostos à luz ultravioleta da radiação solar. Compostos de dois a quatro anéis são mais facilmente degradados do que aqueles que apresentam um maior número de anéis, estando os tempos de biodegradação relacionados com esse número (Lemos et al. 2009).

Estes compostos têm potencial para reciclar e participar em reacções atmosféricas, diversas vezes antes de serem degradados suficientemente, para serem removidos pelo ambiente. Estudos recentes mostram que a toxicidade dos HAPs aumenta através da fotomodificação pela luz solar (Yu 2001). No entanto, a taxa de eliminação de HAPs depende essencialmente da intensidade e frequência da precipitação. O potencial de toxicidade e efeitos ecológicos de HAPs dependem da época do ano em que um incêndio acontece. Por exemplo, um incêndio no início do verão, é mais susceptível de favorecer a concentração de HAPs, devido à evaporação da água e da seca (Neary et al. 1999).

Concluindo, os fogos florestais acarretam impactes ambientais sérios que afectam tanto o ecossistema terrestre como o aquático, esses impactes podem ser imediatos mas também são sentidos dias, meses e anos após o fogo dependendo da geografia, da geologia, do combustível ardido, das condições meteorológicas, da intensidade e duração do fogo. Embora hajam muitos estudos relacionados com fogos florestais e suas consequências nos compartimentos atmosféricos e terrestre, poucos estudos se têm debruçado sobre os

efeitos ecotoxicológicos das cinzas ricas em HAPs nos sistemas aquáticos.

1.3 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

O termo ecotoxicologia foi citado pela primeira vez por Truhaut em 1969, como uma extensão natural da toxicologia, que o definiu como sendo uma ciência que descreve os efeitos tóxicos de diversos agentes em organismos vivos. Essa definição ampla inclui o estudo dos efeitos tóxicos ao nível celular, na população, na comunidade e no ecossistema. O princípio fundamental em que todos os testes de toxicidade são baseados é o reconhecimento da resposta dos organismos vivos quando na presença de agentes tóxicos, sendo esta resposta dependente da dose (nível de exposição) ao agente tóxico. Usando este princípio, os testes de toxicidade aquática são projectados para descrever uma relação concentração-resposta (Hoffman et al. 2003).

Os ensaios ecotoxicológicos são um complemento na caracterização de amostras. Os componentes químicos isolados não determinam a causa da toxicidade, pois no ambiente existem um número distinto de componentes que associados podem gerar substâncias tóxicas para os microrganismos.

A Figura 4 apresenta um esquema representativo do conjunto de parâmetros necessários para um estudo ecotoxicológico.

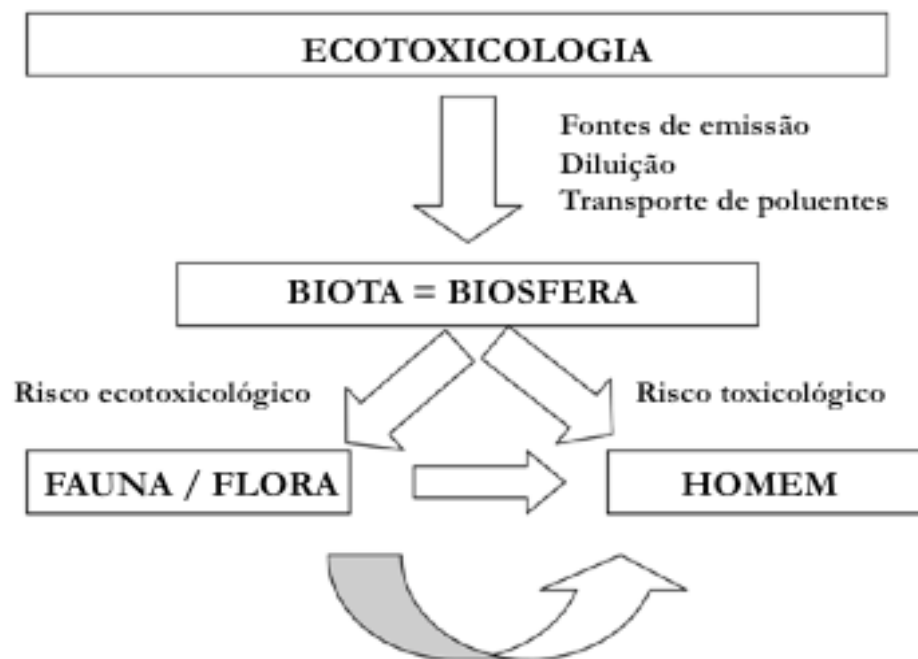


Figura 4- Parâmetros necessários para um estudo ecotoxicológico (Adaptada: Rubinger 2009).

São os ensaios ecotoxicológicos que vão determinar a capacidade que um contaminante (natural ou sintético) tem em produzir efeitos nos seres vivos, tendo como referência um controle sem a substância poluente. Isto porque nem todos os tóxicos afectam da mesma maneira os processos metabólicos e não produzem os mesmos efeitos, diferenciando no modo de actuar e nos receptores em questão. Várias respostas podem ser originadas.

1.3.1 ORGANISMOS TESTE

Para uma avaliação ecotoxicológica mais abrangente devem ser usados organismos de elevada relevância ecológica e de níveis tróficos diferentes. Além disso, os organismos usados em ensaios ecotoxicológicos devem ser facilmente cultivados em laboratório,

devem ser sensíveis a uma variedade de poluentes, e serem de fácil obtenção a partir de fontes comerciais ou mesmo no meio ambiente (EPA 2002). De seguida apresenta-se alguns exemplos de organismos testes geralmente usados em ensaios ecotoxicológicos, tais como: a bactéria *Vibrio fischeri*, a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*, a macrófita *Lemna minor* e o cladóceros *Daphnia magna*.

1.3.1.1 *VIBRIO FISCHERI*

As bactérias fazem parte de um grupo vasto de organismos unicelulares procariontes. A bactéria *V. fischeri* pertence à família *Vibrionaceae*, uma vasta família de bactérias marinhas γ -*Proteobacteria*, que inclui várias dezenas de espécies conhecidas e que são caracterizadas pelas relações de cooperação e interacção com tecidos de outros animais. Estas células apresentam a forma de bastão e medem aproximadamente 0,003 mm, movem-se na água através de um flagelo e alimentam-se de matéria orgânica (Figura 5). Têm grande distribuição geográfica e podem viver sozinhas ou em simbiose com peixes e lulas, vivendo dentro destes animais. Nesta relação, os hospedeiros usam a luz produzida pela bactéria para atrair presas, parceiros ou afastar predadores, enquanto a *V. fischeri* obtém os nutrientes dos quais necessita. A produção de bioluminescência por parte desses microrganismos correlaciona-se com a densidade populacional, ou seja se a concentração de células for elevada elas são capazes de produzir luz (Ruby et al. 2004).

A bactéria, bioluminescente, *V. fischeri* é um dos organismos usados para avaliar a toxicidade de compostos químicos em ecotoxicologia, visto que o seu metabolismo é influenciado por baixos níveis de tóxico o que afecta a intensidade de luz emitida. É também de manipulação prática, segura e é utilizada em métodos fiáveis de culturas e testes.

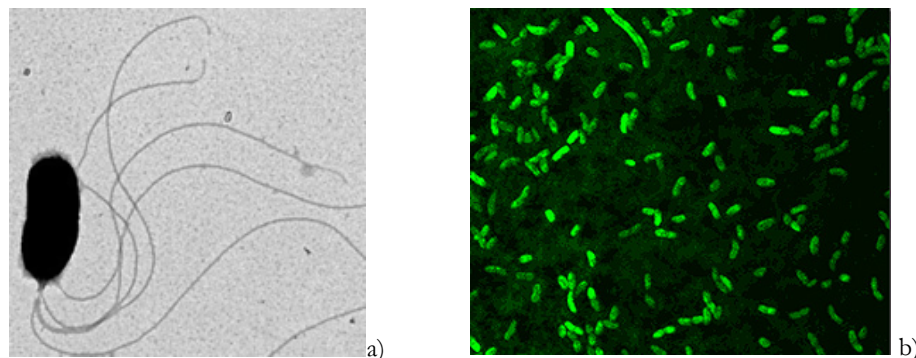


Figura 5- a) *Vibrio fischeri* (Fonte: <http://www.pnas.org>). b) Imagem de colónia de *Vibrio fischeri* luninescente (Fonte: <http://pikaia.wordpress.com>).

1.3.1.2 PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA

As algas fazem parte do grupo de seres vivos aquáticos e autotróficos que produzem a energia necessária ao seu metabolismo através da fotossíntese. A alga *P. subcapitata* pertence ao filo Chlorophyta e à classe Chlorophyceae. É uma alga verde de pequeno tamanho (unicelular) com um único cloroplasto longo em forma de meia lua (Figura 6 a). Frequentemente encontra-se em agrupamentos de 4 a 16 indivíduos ou mais raramente sozinha. A sua reprodução é assexuada, através de auto-esporos que produzem novas células (Cáceres et al. 2008).

Têm um papel essencial nos sistemas aquáticos já que fazem parte do grupo dos produtores primários, produzindo oxigénio, convertendo material inorgânico em orgânico e servindo de sustento para outros organismos, entre eles peixes e vertebrados. Deste modo, dada a sua posição base nas cadeias tróficas, se estas forem afectadas por compostos tóxicos podem afectar directamente a estrutura e função de um ecossistema, resultando na diminuição de oxigénio e produtividade primária (Figura 6 b). Como fornecem uma resposta rápida e sensível aos primeiros sinais de poluição, elas têm sido frequentemente utilizadas em estudos de toxicidade ambiental e aplicadas em diferentes contextos. Os ensaios com microalgas são, em geral, rápidos e económicos e dado que estas algas não aderem às superfícies torna-as vantajosas para a realização dos testes (Pavlic et al. 2005).

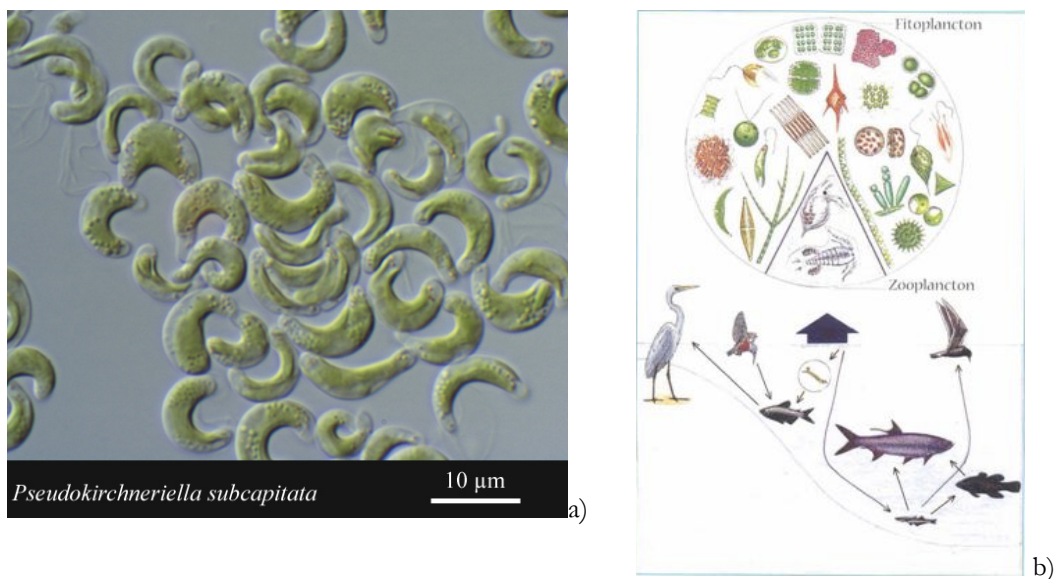


Figura 6- a)Imagem ao microscópio de *P. subcapitata* (Fonte: <http://www.shigen.nig.ac.jp/>).

b)Imagem representativa da cadeia trófica num sistema aquático (Fonte: <http://microalgas.com.sapo.pt/>).

1.3.1.3 LEMNA MINOR

Pertencente à família *Lemnaceae*, *L. minor* é conhecida por Lentilha d'água. *L. minor* é uma macrófita aquática de cor verde com cerca de 4 mm. Embora seja uma planta pequena as suas folhas são facilmente contadas a olho nu. Tem apenas uma raiz, que não está fixa ao sedimento, encontrando-se sob a água (doce ou salobra), em climas temperados (Figura 7). Servem de alimento aos peixes e algumas aves aquáticas, que as consomem em grandes quantidades, o que de certa forma ajuda no equilíbrio do meio. Além disso, fornecem habitat para pequenos invertebrados.



Figura 7- a) Imagem real de *L. minor* (fonte: <http://www.akvarij.net/>). b) Representação esquemática de *L. minor* (fonte: <http://www.mobot.org/>).

A sua reprodução é vegetativa: cada folha produz uma ou mais folhas que depois se tornam plantas independentes, o que faz com que a sua capacidade reprodutiva seja elevada dando origem a um grande número de organismos (Drost et al. 2006).

As suas características fisiológicas (tamanho, elevada capacidade reprodutiva, estrutura simplificada), a facilidade de manipular em laboratório, a sensibilidade aos poluentes e a importante função ecológica fazem delas um organismo teste ideal para ensaios toxicológicos.

1.3.1.4 *DAPHNIA MAGNA*

As *Daphnias* pertencem ao filo Arthropoda, sub-filo Crustacea, ordem Cladocera e à família *Daphniidae*. São um componente do zooplâncton de água doce chamadas em linguagem corrente de “pulga d’água”, já que habitam em charcos e lagos e se movimentam aos pulos. Podendo também sendo encontradas em ambientes marinhos. Existem várias espécies de *Daphnias* todas elas revestidas por um exoesqueleto transparente e podem atingir 5-6 mm de tamanho (Lampi 2005).

Sendo organismos zooplancónicos encontram-se numa posição intermédia das interações tróficas, assumindo um papel importante na transferência de energia entre os diferentes níveis. Fazem parte dos consumidores primários alimentando-se de algas, bactérias e detritos orgânicos e servem de alimento para os peixes (consumidores secundários) (Figura

8). Mantêm assim o equilíbrio nos ecossistemas, visto que não fomentam o crescimento excessivo de algas (que pode levar à eutrofização) e são um meio de subsistência para os vertebrados.

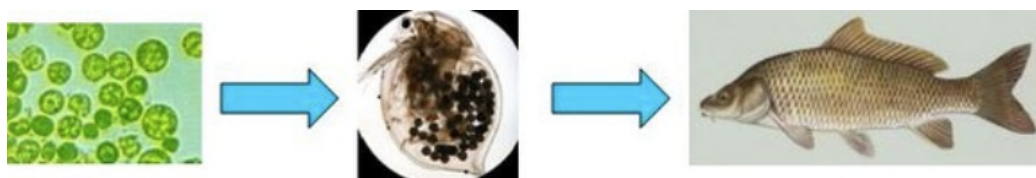


Figura 8- Exemplo de uma cadeia alimentar com a *Daphnia* no papel de intermediário energético (fonte: <http://pulgadagua.blogs.sapo.pt/>).

Nos testes ecotoxicológicos, a espécie mais correntemente utilizada é *D. magna* (Figura 9).



Figura 9- Figura representativa de *D. magna* (Fonte: <http://www.mblaquaculture.com/>).

D. magna apresenta características que fazem dela um dos organismos mais comum usado em trabalhos de investigação. Nomeadamente, pelas suas pequenas dimensões, elevada fecundidade e reprodução partenogénica, proporcionando elevado número de indivíduos geneticamente idênticos às fêmeas progenitoras. Possui ainda um ciclo de vida curto, requer pouco espaço quando em cultura em laboratório e é de cultura fácil com baixo custo (Pereira 2008).

1.4 OBJECTIVOS

Esta dissertação teve como objectivo principal a avaliação da potencial toxicidade das escorrências superficiais provenientes de zonas ardidas em espécies aquáticas de diferentes níveis tróficos. Os objectivos específicos compreendem duas partes distintas mas complementares. Uma primeira parte que inclui a análise físico-química das escorrências superficiais colhidas numa área recentemente ardida com o intuito de compreender o papel dos incêndios florestais como fonte de HAPs para os sistemas aquáticos. Uma segunda parte que comporta a avaliação ecotoxicológica das escorrências usando diferentes espécies aquáticas: *V. fisheri*, *P. subcapitata*, *L. minor* e *D. magna*.

Este estudo tenta dar um contributo para um melhor conhecimento do impacte de fogos florestais nos recursos hídricos. Este trabalho está inserido no âmbito do projecto EROSFIRE II, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT; PTDC/AGR- CFL/70968/2006) que tem, como principal objectivo a medição, análise e modelagem hidrológica, bem como os processos de erosão em zonas queimadas e não queimadas. Enquanto o EROSFIRE-II está dirigido para erosão do solo, esta dissertação está orientada para os efeitos ecotoxicológicos que as escorrências dos incêndios têm nos sistemas aquáticos e de que modo influenciam o biota aquático. Para este fim, o local escolhido para a recolha das amostras foi Sever do Vouga que se encontra, para além de outros, na região geográfica em que o projecto EROSFIRE II trabalha (EROSFIRE 2010).

1.5 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A estrutura desta dissertação foi planeada de modo a que se possam compreender os conceitos nela envolvidos e se perceba clara e objectivamente o trabalho desenvolvido. No capítulo 1 são abordados os principais temas/conceitos, os organismos teste e o objectivo principal da presente dissertação.

No Capítulo 2 dá-se a conhecer a área de estudo, a localização, o clima e os aspectos orográficos.

Os materiais e métodos utilizados são expostos no Capítulo 3. O propósito deste capítulo é proporcionar conhecimento sobre a amostragem, os ensaios efectuados, os microrganismos utilizados e a análise de dados efectuada. No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados das análises dos parâmetros físico-químicos e dos ensaios ecotoxicológicos.

As conclusões e considerações finais deste estudo são apresentadas no Capítulo 5.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo seleccionada correspondeu a uma área que ardeu a 23 de Setembro de 2009 no concelho de Sever do Vouga, localizado no centro de Portugal, distrito de Aveiro (Figura 10). O concelho de Sever do Vouga é atravessado pelo rio Vouga e pelos afluentes: rio Mau, rio Lordelo e rio Teixeira.

O clima desta área de estudo pode ser caracterizado como húmido meso-térmico, com um verão prolongado, seco e quente. As condições climáticas do Mediterrâneo predominam no Verão, com temperaturas elevadas, grande insolação e carência de chuvas; a influência atlântica faz-se sentir no Inverno. A temperatura média anual desta região situa-se entre os 11 e os 13°C, apresentando valores de temperatura mais elevados nos meses de Junho a Setembro e valores mais baixos de Dezembro a Fevereiro. A precipitação varia entre os 1000-1800 mm por ano segundo a Associação Portuguesa do Ambiente (APA 2002). Quanto à humidade relativa do ar, os seus valores mantêm-se constantes ao longo do ano, com índices entre os 75 e os 81 %.

Com uma vegetação mista maioritariamente de eucaliptos e pinheiros é uma zona que reúne as condições ideais para proporcionar o desenvolvimento de grandes incêndios, principalmente por se associar a vegetação arbustiva de grande combustibilidade e ao clima.

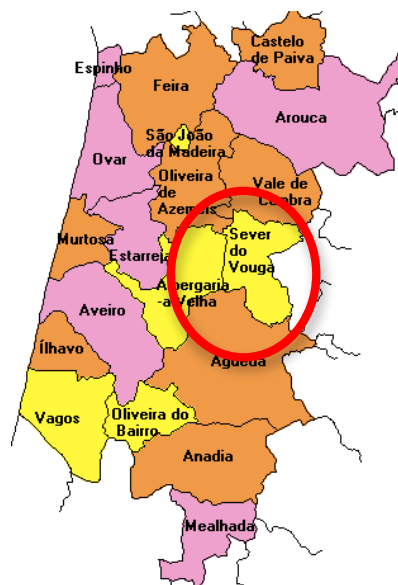


Figura 10- Localização da área de estudo no Distrito de Aveiro (Fonte: <http://www.pcp.pt/>).

2.2 LOCAIS DE AMOSTRAGEM

Dentro da área ardida do Lugar de Braçal foram escolhidas duas encostas pelo grau intenso de severidade do fogo, pela vegetação variada de eucaliptos e pinheiros e pela proximidade entre elas. As duas encostas foram designadas de L e R (Tabela 2). Entre elas seleccionou-se ainda um curso de água para recolha de amostras, o qual foi designado de S). A Figura 11 mostra a localização do fogo na área do Lugar do Braçal.

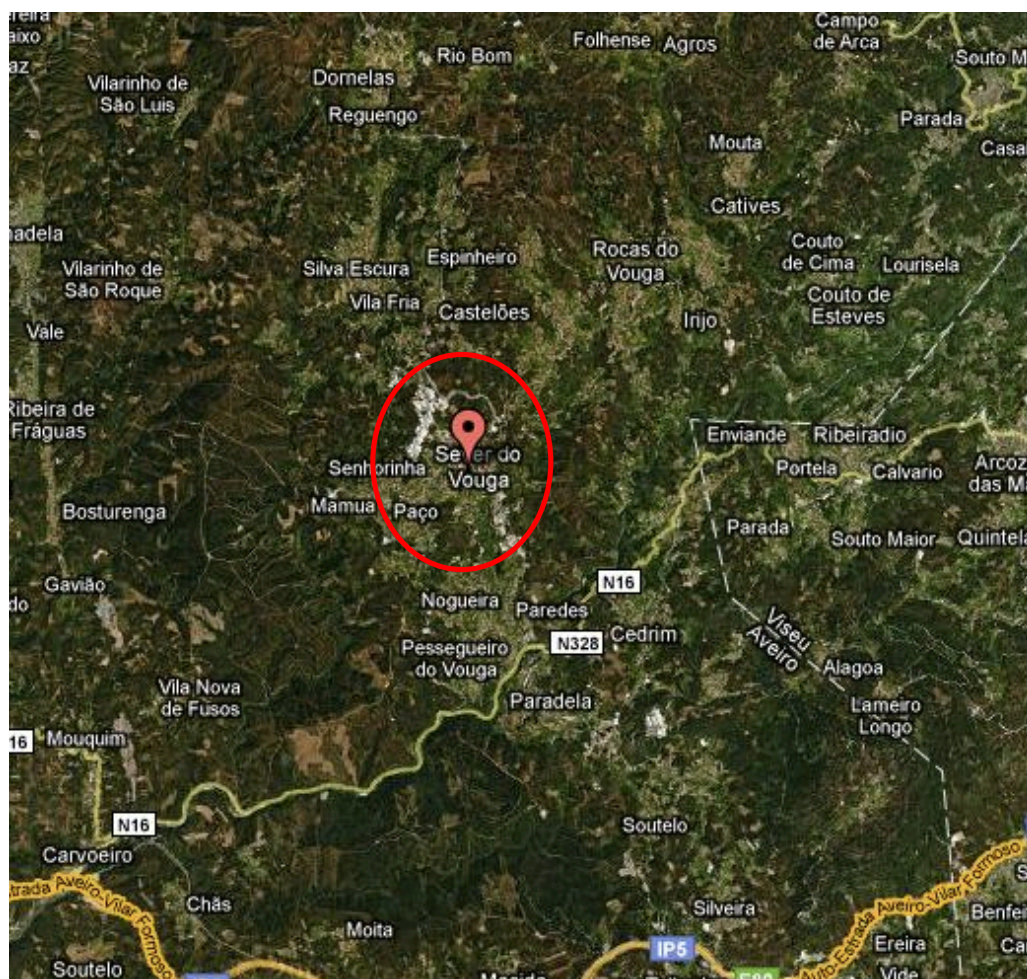


Figura 11- Mapa da localização do incêndio florestal na área de estudo (Fonte: Google maps).

Tabela 2- Pontos de amostragem

Amostra	Ponto de amostragem
Amostra R	Encosta direita
Amostra L	Encosta esquerda
Amostra S	Curso de água

2.3 AMOSTRAGEM

2.3.1 Procedimentos de colheita de amostras

Com o intuito de recolher amostras de escoamentos superficiais, numa primeira ida ao campo, dia 11 de Novembro de 2009, procedeu-se à instalação de 4 parcelas abertas (*open plots*; designadas adiante de O.P.). Cada encosta da área ardida em estudo tinha duas O.P. com os números de O.P.1 e O.P.2 (na encosta direita); O.P.3 e O.P.4 (na encosta esquerda). As O.P. baseiam-se em fazer um tipo de barreira às escoamentos que ocorram na encosta e, por meio de mangueiras, “desviá-las” para os bidões de 30 a 60 L, que efectuam a recolha destas águas (Figura 12). Para que as mangueiras não ficassem entupidas com sedimentos, foram colocados uns filtros em arame nos locais de onde sai a mangueira (Figura 12 b). Desde que haja escoamentos, os bidões estão em constante recolha de amostras. Este funcionamento é contínuo, uma vez que esta estrutura ficou instalada na encosta ao longo de todo o trabalho prático, até à recolha das amostras, passado 9 dias da instalação das parcelas.

Após eventos de precipitação com alguma intensidade, no dia 20 de Novembro foram recolhidas as O.P. e as escoamentos. Estas foram transferidas para garrações de 5L devidamente identificados. Nas colheitas efectuadas a partir da margem do riacho utilizaram-se dois garrações de 5L. As amostras foram armazenadas numa câmara climática a -20°C para posterior caracterização físico-química e ecotoxicológica.

Após a instalação das parcelas foi instalado um pluviómetro graduado na área que serviu para medir a quantidade de água precipitada durante o tempo entre a instalação e a colheita. O volume da quantidade de chuva precipitada foi de 2,10 Litros.



Figura 12- a) Posicionamento de uma O.P. na área de estudo. b) Saída das mangueiras onde se ligam os respectivos bidões.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Parâmetros físico-químicos

Os vários parâmetros físico-químicos medidos nas amostras foram determinados no momento do início dos ensaios ecotoxicológicos com o intuito de se estabelecer uma relação causa-efeito mais efectiva.

Os sólidos suspensos totais (mg/L) foram determinados por gravimetria, tendo-se filtrado 200ml de amostra através de um filtro de fibra de vidro previamente pesado com 1,2 μm de diâmetro de poro, o qual foi seguidamente secado a 105°C durante 24 horas. No caso dos sólidos suspensos voláteis (mg/L), o resíduo obtido na determinação de sólidos

suspensos totais foi submetido à ignição a 500°C numa mufla e posteriormente arrefecido e pesado. A determinação da concentração de sólidos totais e sólidos voláteis seguiram as recomendações de APHA (1995).

Para a obtenção do pH foi utilizado como aparelho de medida um medidor de pH digital. Outros parâmetros medidos em laboratório foram o oxigénio dissolvido expresso em mg/L e em percentagem e a condutividade eléctrica expressa em $\mu\text{s}/\text{cm}$. Para estes dois parâmetros utilizou-se um oxímetro e um conductivímetro, respectivamente.

A medição de parâmetros tais como os nitratos (método de redução de cádmio; mg/L N), nitritos (método calorimétrico; mg/L N), amónia (método de Nessler; mg/L), ortofosfatos (método do ácido ascórbico; mg/L PO_4), sulfatos (mg/L SO_4) e dureza (mg/L CaCO_3) foi efectuada nas amostras (L, R e S) não filtradas e filtradas por filtro de fibra de vidro com 1,2 μm de diâmetro de poro. Os vários parâmetros foram determinados seguindo os procedimentos descritos em APHA (1995).

Para além dos parâmetros acima descritos, determinaram-se também os níveis de HAPs, na fracção particulada e na fracção dissolvida. Para isso, pesaram-se dois filtros para cada uma das três amostras e filtraram-se 250 ml de cada uma delas. As fracções particulada e dissolvida das várias amostras foram analisadas pelo laboratório químico do Centro interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR). O procedimento analítico consistiu na microextração por fase sólida (SPME) numa fibra de PDMS 100 μm e posterior desadsorção num cromatógrafo de Fase Gasosa Varian CP-3800, com um injector split/splitless e com detecção por Espectrometria de Massa Ion Trap Saturn 2200 (GC-MS). O resultado obtido em cada amostra é a média de duas réplicas independentes e está expressa em ng/L.

É de referir que nesta análise foram analisados 16 HAPs definidos pela US EPA – United States Environmental Protection Agency como contaminantes prioritários, devido às suas propriedades potencialmente cancerígenas para animais e seres humanos.

2.5 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

Para a avaliação da toxicidade das amostras recorreu-se a ensaios com organismos aquáticos: bactérias, algas, plantas e crustáceos. Apresenta-se de seguida uma descrição dos respectivos ensaios efectuados.

2.5.1 Teste de inibição de luminescência com *Vibrio fischeri*

É um teste sensível e rápido que mede a luminescência da bactéria *V. fischeri* causada pela exposição a diferentes concentrações do agente tóxico, por um período de 5 e 15 min, através de um analisador microtox usando o Microtox Omni™ Software (versão 4.3.0.1). Para o teste 81.9% basic test foram efectuadas uma série de diluições, seguindo o protocolo AE (1998), usando amostra, diluente Microtox® (solução de NaCl a 2%) e a solução Microtox® de ajuste osmótico (solução de NaCl a 22%). Como a bactéria é conservada a -20°C foi adicionada a solução de reconstituição Microtox® imediatamente antes de cada grupo de ensaios (Cassidy 2010). A redução na intensidade da luz emitida pela bactérias é medida junto com a amostra de controlo. A mudança na saída de luz (inibição metabólica nos organismos), produzida pelo controlo e pelas diferentes concentrações de amostra indica o efeito tóxico presente na mesma. Contrariamente a outros ensaios, este é um teste de rápida execução, que não exige manutenção de organismos em laboratório (a suspensão de bactéria é congelada e conservada durante um período relativamente longo), apesar do seu custo de aquisição e de manutenção ser muito elevado.

2.5.2 Teste de inibição de crescimento com *Pseudokirchneriella subcapitata*

O objectivo deste teste é determinar os efeitos que as diferentes concentrações da amostra têm no crescimento de microalgas. O crescimento, neste teste é definido como o aumento na densidade de células durante o período de exposição. Neste caso, para a espécie *P. subcapitata* utilizou-se a metodologia definida pela OECD Guidelines for testing of Chemicals (OECD 2006) e a metodologia definida pela EPA (2002). Este ensaio foi validado de acordo com os critérios de validação predefinidos nos respectivos protocolos. As fórmulas usadas no cálculo da taxa de crescimento (equação 1) e na percentagem de inibição da taxa de crescimento (equação 2) são apresentadas de seguida.

Equação 1- Taxa de crescimento

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln B_j - \ln B_i}{t_j - t_i} d^{-1}$$

onde:

μ_{i-j} é a taxa média de crescimento desde i até j

B_j é a concentração de biomassa no tempo j

B_i é a concentração de biomassa no i tempo;

t_j é o tempo inicial do teste

t_i é o tempo final do teste

Equação 2- Percentagem de inibição da taxa de crescimento

$$\%I = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

onde:

$I\%$ é a percentagem de inibição da taxa de crescimento

μ_c é o valor médio de μ no controlo

μ_T é o valor médio de μ no tratamento.

As culturas de algas foram mantidas em erlenmeyer de 250 ml com 100 ml do meio de cultura MBL (*Woods Hole* MBL), preparado com água destilada, nutrientes e vitaminas. As culturas foram mantidas em câmaras climáticas com temperatura controlada ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) e sujeitas a um fotoperíodo de $16\text{h}^{\text{L}}:8\text{h}^{\text{D}}$. Para se iniciar novas culturas, as algas foram colhidas na fase exponencial de crescimento 5-7 dias de idade e inoculadas em meio fresco (Abrantes 2007).

Para o teste, foram realizadas 3 réplicas para cada concentração de 12,5%, 25%, 50%, 75%, 100%, 100%+nutrientes e outras três réplicas para o controle, contendo apenas meio de cultura (MBL). No 100%+nutrientes para além do procedimento normal acrescentou-se uma mistura de micro nutrientes e macro nutrientes correspondente à concentração da formulação do meio MBL. Para determinar a densidade celular inicial, mediu-se a absorvância do inóculo no espectrófotómetro a 440nm. Os ensaios foram realizados em erlenmeyers com um volume total de 40 ml. O ensaio teve a duração de 96h, e foi mantido nas mesmas condições do inóculo e em constante agitação (100 r.p.m.) num agitador orbital. Este teste foi efectuado para as amostras L, R filtradas e não filtradas. Para a amostra S apenas foi realizado com a amostra não filtrada, devido ao seu baixo conteúdo de sólidos.

No fim dos testes as células foram contadas numa câmara de Neubauer com uma ampliação ocular de 10X e objectiva 40X.

2.5.3 Teste de inibição de crescimento com *Lemna minor*

Segundo a OECD (Guidelines for the testing of chemicals) o objectivo deste teste é quantificar os efeitos que uma determinada amostra tem no crescimento das Lemnas, durante o tempo do teste. Com base no protocolo 221 de OECD (2006) foram calculados, para cada um dos parâmetros, a taxa de crescimento específico (equação 1) e a respectiva percentagem de inibição da taxa de crescimento específico (equação 2). Convém referir que este ensaio foi validado de acordo com os critérios de validação predefinidos no protocolo.

Equação 1- Taxa de crescimento específico

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i}$$

onde:

μ_{i-j} - é a taxa de crescimento específico desde i até j

N_j - é a variável medida na réplica no tempo j

N_i - é a variável medida na réplica no tempo i

t_j - é o tempo final do teste

t_i - é o tempo inicial do teste

Equação 2- Percentagem de inibição da taxa de crescimento específico

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100$$

onde:

I_r % - é a percentagem de inibição da taxa de crescimento específico

μ_c - é o valor médio de μ no controlo

μ_T - é o valor médio de μ no tratamento.

As culturas de *Lemna* foram mantidas em erlenmeyer de 250 ml com 100 ml do meio de cultura Steinberg, preparado com água destilada e micro e macro nutrientes, realizado de acordo com o protocolo da OECD de 2006 (OECD 2006). A cultura de *L. minor* foi mantida numa câmara climática à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e com um fotoperíodo de $16\text{h}^{\text{L}}:8\text{h}^{\text{D}}$. Para manutenção, as culturas foram mudadas duas a três vezes por semana, colocando num novo meio de culturas algumas folhas da cultura anterior

Para o ensaio foram preparadas 3 réplicas para o controlo e para as seguintes concentrações: 12,5%, 25%, 50%, 75%, 100% e 100%+nutrientes. Na concentração de 100%+nutrientes para além do meio juntaram-se os micro e macro nutrientes. No início do ensaio, para o calculo da biomassa inicial baseada no peso seco foram levadas à estufa (a 60°C .) e seguidamente pesadas 3 plantas com 3 folhas de *L. minor*. Para cada amostra realizaram-se dois ensaios, com amostra filtrada e não filtrada. Seguidamente, em cada

frasco colocaram-se 3 plantas de *L. minor* com 3 folhas cada. O ensaio permaneceu 7 dias nas mesmas condições que as culturas iniciais. Ao fim de 7 dias, o número de folhas de cada réplica foi contado, colocado em recipientes (identificados) e foi à estufa a 60°C, permitindo obter a biomassa final. O teste foi realizado para as amostras L, R filtradas e não filtradas. Pelas mesmas razões apresentadas no ensaio com a *P. subcapitata*, apenas foram efectuados testes com a amostra S não filtrada.

2.5.4 Teste de reprodução com *Daphnia magna*

O objectivo deste teste é determinar o efeito que as amostras têm no número total de descendência produzido por cada animal vivo durante o ensaio, assim como os efeitos no seu crescimento somático

As culturas de *D. magna* foram mantidas em laboratório com um fotoperíodo de 16h^L:8h^D e temperatura de 20±2°C em meio sintético ASTM hardwater (ASTM 1980), fornecido com um aditivo orgânico. As culturas eram renovadas a cada dois dias e os organismos transferidos para um novo recipiente e alimentados à taxa de 3.0x10⁵ cell/ml/dia com a alga *P. subcapitata*. Para a manutenção da cultura de *D. magna* foram mantidos cerca de 40 indivíduos em frascos de 800 mL.

A metodologia adoptada e a validação deste teste foram baseadas num protocolo padronizado pela OECD (Guidelines for testing of Chemicals) em 1998. Foi realizado um teste por cada amostra, onde se usaram 70 neonatos com menos de 24 h de vida nascidos entre a 3^a e a 5^a ninhada. Para cada concentração foram feitas 10 réplicas, em frascos de 25ml, onde os organismos eram expostos individualmente, no controlo e nas seguintes concentrações de amostra: 12,5%, 25%, 50%, 75%, 100%, 100% filtrado. Para o 100% filtrado, fez-se passar um volume de amostra por um filtro de fibra vidro de 1,2µm.

O teste teve a duração de 21 dias, terminado quando 60% das fêmeas no controlo atingiram a 3^a ninhada. A cada 2 dias o meio era renovado, acrescentando um volume calculado a partir da concentração da suspensão da alga e do volume dos frascos de *D. magna*. Tendo em vista o objectivo do teste, cada vez que as *D. magna* produziam descendência o número de juvenis era contado, registado e descartado, isto até à 3^a

ninhada, sendo depois finalizado o teste. Durante o teste também foram medidos, com a ajuda de uma ocular micrométrica calibrada (lupa Olympus SZX9), o comprimento do 1º exopódito da 2ª antena da exuvia (figura 13), no começo do ensaio, aquando a 1º e no fim do ensaio.

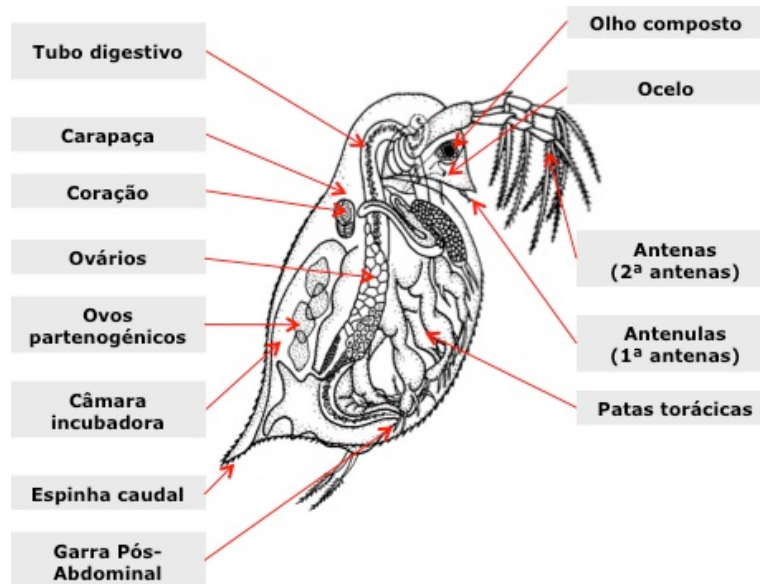


Figura 13- Representação esquemática da anatomia de *D. magna* (Fonte: <http://7daphnia.blogs.sapo.pt/>).

Com base nos parâmetros medidos foram determinados a taxa de crescimento diário (dias⁻¹) (TCD), que analisa o crescimento somático das mães e a taxa de crescimento intrínseco (dias⁻¹) (r), que integra idade de maturação, o número de neonatos e idade em cada ninhada. Na equação 1 é apresentada a TCD e na equação 2 a r. Este teste foi apenas realizado para as amostras R e S.

Equação 1- Taxa de crescimento Diário

$$TCD = \frac{(\ln(N_f) - \ln(N_i))}{t}$$

onde:

TCD- é a taxa de crescimento específico desde i até f

N_f- é o tamanho final das mães

N_i- é o tamanho inicial das mães

t- número de dias de duração do teste

Equação 2- Taxa de crescimento Intrínseco (r)

$$\sum_{x=\alpha}^w l_x e^{-rx} m_x = 1.0$$

onde:

l_x - é a probabilidade de sobrevivência à idade x ,

m_x - é a fecundidade cumulativa à idade x

α - é a idade à maturidade

w - é a máxima idade em que houve reprodução.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir da relação dose-resposta foi calculada a concentração da amostra que inibe 50% da luminescência (EC_{50}) da espécie *V. fischeri*, pelo programa Microtox Omni™ Software version 4.3.0.1 (Hoffman et al. 2003).

Para os ensaios com *P. subcapitata*, *L. minor* e *D. magna* foi efectuada uma ANOVA unifactorial seguida de um teste de Dunnet, para avaliar se existiam ou não diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes concentrações e o controlo. A partir dos resultados obtidos foram determinados o LOEC (concentração com menor efeito observável) e o NOEC (concentração sem efeito observável). No caso de *L. minor* e *P. subcapitata* foi efectuado um teste t de student, para verificar se existiam diferenças significativas entre a concentração de 100% e a concentração de 100% com adição de nutrientes. O mesmo teste foi efectuado para *D. magna* mas neste caso para verificar diferenças entre o 100% e o 100% Filtrado. Quando não foram verificados os pressupostos do teste t de student (normalidade e homogeneidade) efectuou-se um teste de U de Mann Whitney (não paramétrico).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os valores dos parâmetros físico-químicos medidos no presente estudo estão representados nas Tabelas 3, 4 e 5.

Na Tabela 3 são apresentados os valores dos vários parâmetros básicos determinados incluindo pH, condutividade eléctrica, oxigénio e sólidos suspensos totais e voláteis. Relativamente ao pH, observou-se que todas as amostras têm pH ligeiramente inferior a 7, ou seja pH ácido, não demonstrando uma variação significativa entre as 3 amostras. De acordo com Laranjeira e Leitão (2008) valores elevados de pH são resultado da influência do fogo e da presença de cinzas que são ricas em minerais do solo. Ainda segundo os autores Shakesby e Doerr (2006), imediatamente após um incêndio o pH dos rios pode ser afectado pela deposição directa das cinzas nos cursos de água e que no primeiro ano após o fogo, o aumento dos valores de pH dos solos também poderá contribuir para este aumento do pH da água dos rios. Deste modo, os valores de pH registados neste estudo não reflectem a influência do incêndio.

Em relação aos valores condutividade eléctrica, os dados indicam tratar-se de águas poucas mineralizadas com baixo conteúdo de sais (Tabela 3). Laranjeira e Leitão (2008) citando outros autores verificaram a existência de variações na condutividade numa área ardida que apresentava um valor de 46 μ S/cm antes do incêndio e de 66 μ S/cm após o mesmo atribuindo tal aumento à presença de cinzas na água. Um outro trabalho mostra que numa encosta ardida, os valores da condutividade poderão ser influenciados pela ocorrência das chuvas, uma vez que os dados sugerem que as precipitações conduziram à ocorrência de erosão dos solos e, consequentemente, ao transporte de sedimentos e de cinzas presentes ainda nessa encosta, fazendo com que os valores médios deste parâmetro diminuíssem (Capela 2008).

Os valores de oxigénio dissolvido (mg/L) (Tabela 3) mostram que as amostras são pouco oxigenadas, visto que os valores oscilaram entre 6,01mg/L no local L e 7,03 mg/L

no local S. O valor mais elevado pertence ao local S, visto ser aquele que sofre maior oxigenação por ser um curso de água corrente que favorece o metabolismo aeróbio dos organismos aquáticos. Earl e Blinn (2003) mostraram que a condutividade eléctrica e o pH nos rios aumentam imediatamente após as cinzas dos incêndios alcançarem as águas e que o oxigénio dissolvido destas águas, consequentemente, diminui. No entanto, após um período de quatro meses, os valores destes parâmetros tendem a voltar às condições originais de pré incêndio.

Analisando os valores de sólidos suspensos totais e voláteis (Tabela 3), verifica-se que a amostra L é a que apresenta valores mais elevados, seguida da R e da S. Apesar das amostras R e L serem ambas escorrências, a amostra L apresentou um valor mais elevado pois, efectivamente, no campo não existem locais iguais existindo alguma heterogeneidade. No entanto, a encosta L pode ter sido afectada por uma maior severidade de incêndio, pois este local apresentava árvores queimadas sem folhas, o que diferencia os valores de sólidos. A amostra S, como esperado, é a que apresenta menor quantidade de sólidos, pois corresponde a um curso de água.

Tabela 3- Parâmetros básicos determinados nas amostras de escorrências (L e R) e na amostra do curso de água (S).

	L	R	S
pH	5,600	5,480	5,990
Condutividade (μs/cm)	39,100	43,500	54,600
Oxigénio (mg/L)	6,010	6,520	7,030
Oxigénio (%)	54,800	59,600	63,60
Sólidos suspensos totais (mg/L)	0,028	0,006	0,002
Sólidos suspensos voláteis (mg/L)	0,017	0,004	0,001

Na Tabela 4 são apresentadas as análises aos nutrientes efectuadas nas três amostras (L, R e S). Através de uma visão global da Tabela 4 e comparando o filtrado com o não filtrado temos que, no filtrado os nutrientes estão presentes em menores quantidades, pois o não filtrado retém maior quantidade destes. Em relação aos nitratos e sulfatos medidos nas

várias amostras filtradas e não filtradas, todos os valores se apresentaram inferiores ao limite de detecção <1 mg/L N e <5 mg/L SO_4 , respectivamente. Shakesby e Doerr (2005) afirma que os nitratos são perdidos quando as temperaturas atingem os 204°C . No entanto, para temperaturas mais baixas do que 371°C o mesmo estudo refere que as perdas de sulfato podem ser significativas. Mas quando as temperaturas alcançam valores na ordem dos 802°C , todo o nitrato e sulfato são volatilizados, o que poderá explicar os valores de nitratos e sulfatos abaixo dos limites de detecção.

No caso do nitrito já houve algumas discrepâncias nos valores. O valor mais elevado pertence ao local R com 0,05 mg/L N. O local R apresenta maiores quantidades de nitrito no não filtrado enquanto que no local L aconteceu o inverso. Também os valores de amónia foram inferiores ao limite de detecção (<1 mg/L) para todas as amostras. No entanto, um estudo realizado por Earl e Blinn (2003) mostrou que a alcalinidade, nitrato e amónia se apresentaram elevados no afluente East Fork seis semanas após o fogo. Muitos outros estudos mostram que algumas concentrações de compostos como nitratos, fósforo, fosfato, amónia e compostos voláteis aumentam nos rios após um incêndio de grande intensidade. Uma possível explicação para o aumento dos valores das concentrações de nitratos poderá ficar a dever-se à solubilização dos nitratos disponíveis nos solos como consequência da água dos primeiros eventos de precipitação e o seu consequente arrastamento ao longo da encosta ardida. No entanto, em alguns casos, a diferença antes e após o incêndio não é muito significativa.

No que concerne aos orto-fosfatos observou-se que os valores na amostra S foram inferiores ao limite de detecção, quer no filtrado quer no não filtrado. Já os valores das amostras L e R foram maiores no não filtrado do que no filtrado, o que se pode explicar pela presença de sedimentos e de cinzas na superfície do solo, que possivelmente foram libertados pela combustão do fogo e que, consequentemente, foram sendo arrastados pela encosta abaixo por acção da chuva e do vento.

A água tem dissolvidos vários sais minerais que lhe conferem um grau de dureza, neste caso, como se pode ver na Tabela 4 os valores oscilam entre os 21 e 4 mg/L CaCO_3 , que correspondem respectivamente à amostra S (filtrada) e amostra R (não filtrada). O curso de água (amostra S), apresentou maior dureza do que qualquer um dos outros locais, isto porque grandes quantidades de nutrientes foram mineralizados e o solo sofreu a passagem de água, aumentando a erosão e o arrastamento deste (Thomas et al. 1999). Ao contrário da

maioria dos outros valores, no caso da dureza os valores referentes ao filtrado são maiores que o não filtrado.

Tabela 4- Nutrientes determinados nas amostras de escorrências (L e R) e na amostra do curso de água (S).

		Nitratos	Nitritos	Amónia	Orto-fosfatos	Dureza	Sulfatos
		(mg/L N)	(mg/L N)	(mg/L)	(mg/L PO ₄)	(mg/L CaCO ₃)	(mg/ L SO ₄)
Filtrado	L	<1	0,03	<1,0	0,08	9	<5
	R	<1	<0,01	<1,0	<0,05	7	<5
	S	<1	<0,01	<1,0	<0,05	21	<5
Não-Filtrado	L	<1	<0,01	<1,0	0,16	8	<5
	R	<1	0,05	<1,0	0,06	4	<5
	S	<1	<0,01	<1,0	<0,05	19	<5

Em resumo, da análise da tabela 4 verifica-se que : i) em muitos casos os valores estiveram abaixo do limite de detecção da técnica de análise; ii) o local S é o que apresenta menor quantidade de nutrientes e maior dureza, iii) o local R e L são os mais homogêneos, havendo algumas diferenças nas concentrações de nitritos e orto-fosfatos e ii) a não verificação de valores substanciais de nitratos, amónia e sulfatos mostra que o incêndio não teve grande impacto nestes nutrientes.

Na tabela 5 são mostrados os valores dos HAPs medidos nas várias amostras, quer na parte partícula, quer dissolvida.

Tabela 5- Valores de HAPs (ng/L) medidos na parte particulada e na parte dissolvida das amostras de escorrências superficiais (L e R) e da amostra de água colhidas no curso de água (S).

	Limite de detecção (LD)			Parte Dissolvida			Parte Particulada		
	L	R	S	L	R	S	L	R	S
Naftaleno	1,52			18,7±3,8	35,7±4,3	30,5±3,7	102±11	90,8±8,6	88,5±0,6
Acenaftileno	0,91			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Acenafteno	0,92			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Fluoreno	0,71			<LD	<LD	<LD	42,9±5,5	45,9±2,9	24,3±2,9
Fenantreno	1,90			3,89±0,39	3,90±0,24	3,23±0,09	103±12	79,0±4,1	55,8±7,6
Antraceno	0,87			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Fluoranteno	1,06			1,47±0,16	1,35±0,20	1,44±0,08	12,2±1,1	10,9±0,94	4,97±0,01
Pireno	0,48			0,67±0,04	0,73±0,06	0,62±0,04	7,80±0,68	5,53±0,81	3,06±0,22
Criseno	1,66			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benz[a]antraceno	0,71			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[k]fluoranteno	0,62			<LD	<LD	<LD	5,90±0,38	<LD	<LD
Benzo[b]fluoranteno	0,75			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[a]pireno	1,82			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Ideno[1,2,3-cd]pireno	1,82			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Dibenz[a,h]antraceno	0,80			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Benzo[ghi]perileno	1,86			<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

Vários HAPs foram encontrados na parte dissolvida e na parte particulada nas três amostras (L, R e S). A detecção de hidrocarbonetos aromáticos nas amostras além de resultar das cinzas pode resultar da erosão e arrastamento de sedimentos do solo, devido à ocorrência de precipitação pós-incêndio. Coloca-se também a hipótese de que o aumento do pH a seguir ao incêndio florestal incrementa a dissolução da matéria orgânica e como tal a mobilização e redistribuição dos HAPs do solo associados à matéria orgânica (Laranjeira e Leitão 2008). Como esperado, a parte particulada apresentou maior concentração de HAPs, que estão relacionados com o alto conteúdo de cinzas presentes no escoamento superficial, já que os HAPs formados durante o processo de combustão ficam adsorvidos nas partículas de cinzas, as quais constituem um importante meio de transporte através dos

poros do solo de poluentes orgânicos para os sistemas aquáticos. A adsorção de HAPs nas partículas de cinzas tem uma importante implicação no transporte e destino no ambiente.

Os valores registados para alguns HAPs foram inferiores ao limite de detecção (acenaftitelo, acenafteno, antraceno, criseno, benz[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[a]pireno, ideno[1,2,3-cd]pireno, dibenz[a,h]antraceno, benzo[ghi]perileno). Espécies de baixo peso molecular (2-3 anéis) e médio peso molecular (4 anéis) foram predominantes em ambas as partes. De uma maneira geral, a predominância de espécies HAPs foi a seguinte: naftaleno > fenantreno > fluoranteno > pireno, na parte dissolvida; naftaleno > fenantreno > fluoreno > fluoranteno > pireno > benzo[k]fluoranteno, na parte particulada. De acordo com Schafer et al (2010), num estudo efectuado na Austrália, a distribuição por tamanho do anel mostra um predomínio de HAPs de três e quatro anéis e foi mais elevada nos locais que estavam mais próximos do fogo. O naftaleno (2 anéis), fenantreno (3 anéis) e fluoranteno (4 anéis) estão presentes em grandes quantidades em todas as amostras, tanto na parte particulada como na dissolvida, estando em maior concentração na parte dissolvida. De igual modo, Vila-Escalé et al (2007) referem encontrado principalmente HAPs de baixo peso molecular (fenantreno e fluoranteno) numa zona pós-incêndio e estes diminuíram com o tempo. Os HAPs com menor peso molecular têm maior solubilidade e portanto maior disponibilidade num ambiente aquático.

Em geral, na parte dissolvida foi a amostra R que apresentou valores de HAPs mais elevados. Contudo, na parte particulada os valores mais elevados foram registados na amostra L o que pode ser explicado pelo alto teor de sólidos presente.

Observou-se ainda para a generalidade das amostras e em ambas as partes que o fluoranteno apresentou valores mais elevados do que o pireno, sendo esta predominância atribuída a origens pirolíticas com altas temperaturas de combustão (Laranjeira e Leitão 2008).

3.2 PARÂMETROS ECOTOXICOLÓGICOS

3.2.1 Ensaio com *Vibrio fischeri*

Os valores de EC_{50} para a bactéria *V. fischeri* nas amostras L, R e S no filtrado e no não filtrado, para 5 e 15 minutos, estão descritos na Figura 14 e na Tabela 6. Em geral, as amostras não filtradas foram mais tóxicas que as filtradas. Comparando a resposta de *V. fischeri* exposta às várias amostras, verificou-se a seguinte ordem decrescente de toxicidade: amostra S > amostra L > amostra R.

Na amostra L, foi observada inibição no não filtrado, aos 5 minutos com um EC_{50} de 33%. Em relação à amostra R, praticamente não foi verificada inibição, não se verificando, por isso, toxicidade, $EC_{50} > 100\%$ aos 5 minutos, no filtrado e no não filtrado. Foi possível observar na amostra R estimulação da luminescência da bactéria.

Na amostra S foi observada inibição no não filtrado, tendo a mesma aumentado aos 15 minutos. Assim, este local apresentou toxicidade com EC_{50} de 12% aos 5 minutos e aumentou a toxicidade aos 15 minutos com um EC_{50} de 8% (Tabela 6). No filtrado não apresenta toxicidade. A maior toxicidade observada para a amostra S, onde as concentrações de HAPs são em geral inferiores às medidas nas amostras L e R, pode-se dever à presença de compostos inorgânicos, como evidenciado por Salizzato et al (1998), embora os HAPs, devido à baixa solubilidade em água, se tornem mais disponíveis para as bactérias.

No entanto, o meio de cultura contendo a bactéria é conhecido por ser rico em nutrientes orgânicos para manter a bactéria viva durante o teste, após a reconstituição. A concentração de contaminantes ambientais em amostras de água pode ser afectada pelo teor de matéria orgânica do reagente Microtox ou por outro conteúdo orgânico da amostra (Richardson 1993). Numerosos estudos têm demonstrado que os contaminantes ambientais, podem ser complexados, precipitados ou adsorvidos em material orgânico ou biomassa activa, reduzindo assim a sua viabilidade e toxicidade.

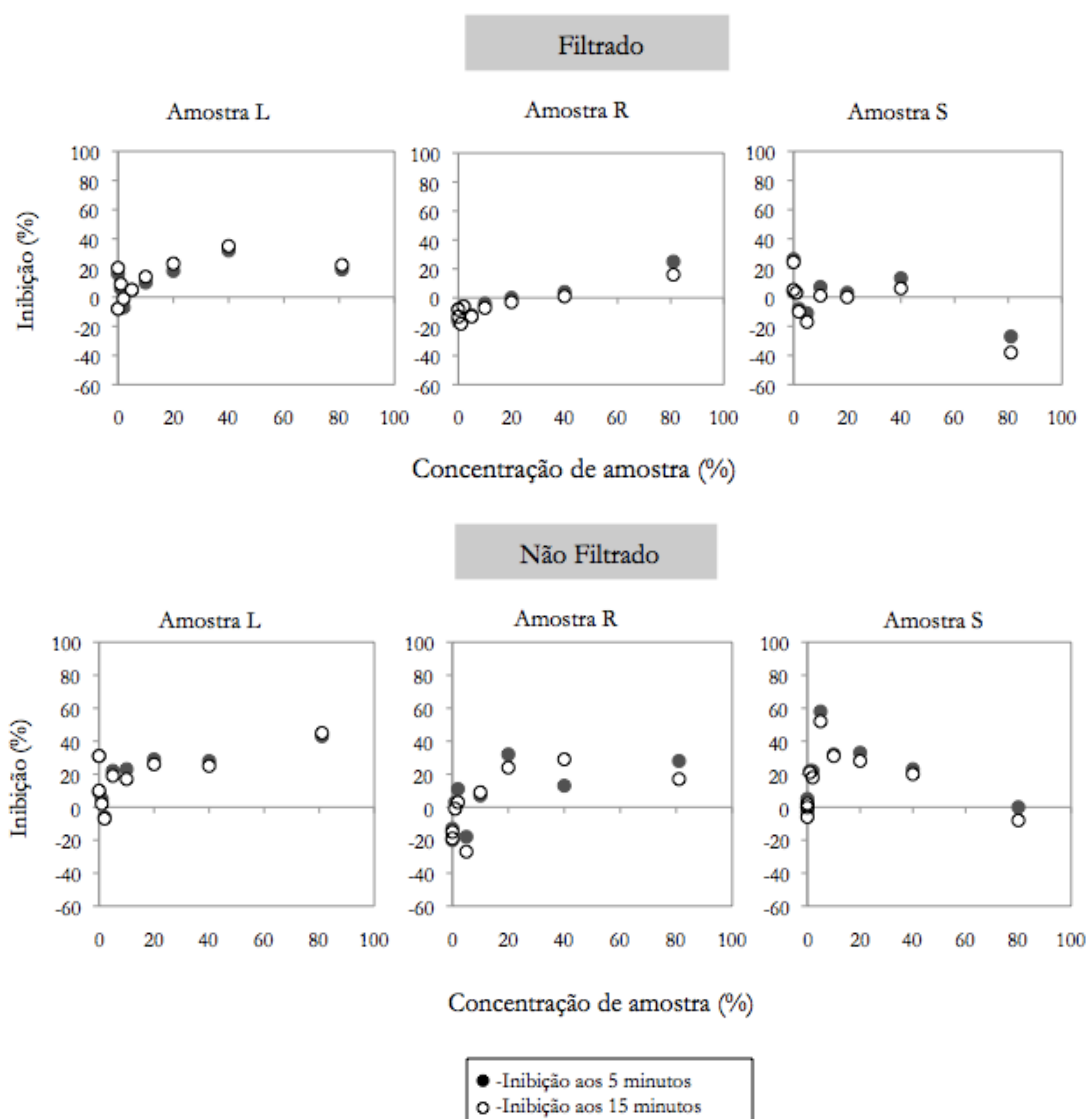


Figura 14 -Inibição de luminescência para *V. fischeri* para as diferentes amostras filtradas e não filtradas.

Tabela 6- Síntese dos valores de EC_{50} em percentagem de amostra para 95% de confiança para a inibição de luminescência de *V. fischeri*, aos 5 e 15 minutos.

	Filtrado		Não Filtrado	
	EC_{50} (%) 5min	EC_{50} (%) 15min	EC_{50} (%) 5min	EC_{50} (%) 15min
L	ND*	ND*	33 (1,0-589,0)	ND*
R	>100	ND*	>100	ND*
S	ND*	ND*	12 (1,0-102,0)	8 (0,0-236,0)

*ND- Não determinado

3.2.2 Ensaaios com *Pseudokirchneriella subcapitata*

A Figura 15 e a Tabela 7 representam os ensaios com *P. subcapitata* exposta às diferentes amostras filtradas e não filtradas. Pode-se verificar que as amostras L e R, ao contrário da amostra S, provocaram efeitos significativos ($p < 0,05$) na taxa de crescimento de *P. subcapitata*. Assim, pode-se observar que o valor de NOEC é de 75% para as amostras L e R, no filtrado e no não filtrado. Na amostra S, a ausência de toxicidade não permitiu calcular valores de LOEC e NOEC. Assim, as amostras mais tóxicas foram a L e a R, sendo a menos tóxica a amostra S. Esta aparente maior toxicidade mostrada pelas amostras R e L em relação à amostra S, pode estar relacionada com a maior concentração de HAPs, nomeadamente fenantreno, fluoreno e pireno, os quais podem ter promovido a diminuição na taxa de crescimento. Para as amostras L e R, comparando o filtrado com o não filtrado, observou-se que estes apresentam valores iguais de NOEC e LOEC o que demonstra que eliminando a componente particulada os efeitos continuaram a ser observados. Ou seja, os HAPs na parte dissolvida embora em menor concentração do que na parte particulada continuaram a provocar efeitos negativos na TC.

Existiram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a concentração de 100% e a concentração 100% com adição de nutrientes (Tabela 8), apenas para a amostra R ($P = < 0,001$) o que indica que o efeito observado no 100% se deveu à falta de nutrientes na amostra natural. Para a amostra L no filtrado, houve apenas diferença com o controlo no 100% que se pode dever à falta de nutrientes das amostras, pois quando se adicionaram nutrientes ao meio houve uma estimulação no crescimento. No não filtrado a amostra L já apresentou diferenças com o controlo no 100% e no 100% mais nutrientes, que se pode dever ao facto da presença de naftaleno, fenantreno, fluoreno, pireno e benzo[k]fluoranteno. Não se descarta também a hipótese de esta amostra ter uma elevada quantidade de sólidos que dificulta a passagem de luz, essencial para o crescimento da alga. Quanto à amostra S não foram apresentadas diferenças significativas entre as diferentes concentrações e o controlo nem entre a concentração de 100% e 100% com adição de nutrientes ($p = 0,256$).

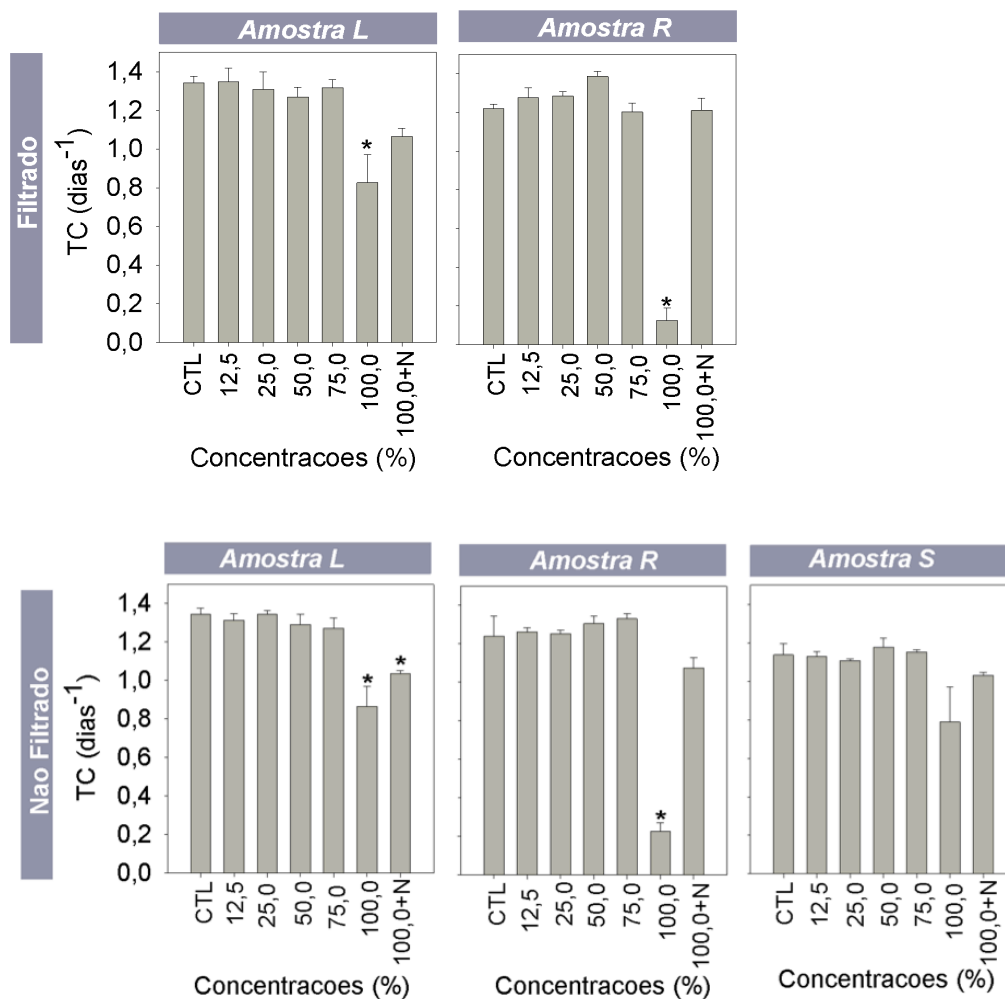


Figura 15- Taxa de crescimento (dias⁻¹) determinada para *P. subcapitata* quando exposta às diferentes amostras filtradas e não filtradas. As barras de erro indicam o erro padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controle ($p < 0.05$).

Tabela 7- Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento (dias⁻¹) de *P. subcapitata* e valores de NOEC e LOEC obtidos.

	Amostras	df	MS _{res}	F _{ratio}	H	p	NOEC	LOEC
Filtrado	L	6	0,114	6,374	0,684	0,002	75%	100%
	R	6	0,568	90,220	3,41	<0,001	75%	100%
Não-Filtrado	L	6	0,102	12,081	0,612	<0,001	75%	100%
	R	6	0,465	57,962	2,788	<0,001	75%	100%
	S	6	ND*	ND*	14,207	0,027	ND*	ND*

*ND- Não determinado

Tabela 8- Resumo do teste t de student de comparação das taxas de crescimento (dia⁻¹) de *P. subcapitata* entre a concentração de 100% e 100% com adição de nutrientes.

	Amostras	df	t	p
Filtrado	L	4	-1,596	0,186
	R	4	-11,972	<0,001
Não-Filtrado	L	4	-1,603	0,184
	R	4	-11,798	<0,001
	S	4	-1,323	0,256

3.2.3 Ensaíos com *Lemna minor*

Na Figura 16 e na Tabela 9 estão resumidos os efeitos das amostras filtradas e não filtradas na taxa de crescimento (dias⁻¹) de *L. minor*. Pode-se verificar que as amostras L, R e S apresentaram efeitos inibitórios para *L. minor*.

Pela Tabela 10 pode-se observar que não foram detectadas diferenças significativas em nenhuma das amostras filtradas ($p > 0,05$). Por outro lado, nas amostras não filtradas observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o 100% e o 100%+ nutrientes, na amostra L ($p = 0,001$). No entanto, nas amostras L e S (não filtradas) o NOEC

correspondeu à concentração de 75% e o LOEC de 100%. Na amostra R não filtrada o LOEC foi de 12,5%. A amostra mais tóxica é a R seguida da L e S. O comportamento de *L. minor* para as amostras filtradas e não filtradas foi díspar, ou seja excluindo a parte particulada das amostras e consequentemente o teor de HAPs deixa-se de ter efeitos inibitórios para esta espécie.

No não filtrado as amostras S e L mostraram diferenças na concentração de 100% com o controlo. O facto da concentração 100% com adição de nutrientes não ter apresentado diferenças significativas em relação ao controlo sugere que a diferença observada no 100% se deveu à falta de nutrientes das amostras. Tendo em conta que a amostra R teve diferenças com o controlo em todas as concentrações e considerando que a inibição não é derivada da falta de nutrientes, poderá ser explicada pela presença de substâncias tóxicas, tais como o fluoreno e a quantidade de nitritos (0,05 mg/L N) que se pode tornar tóxico para as macrófitas.

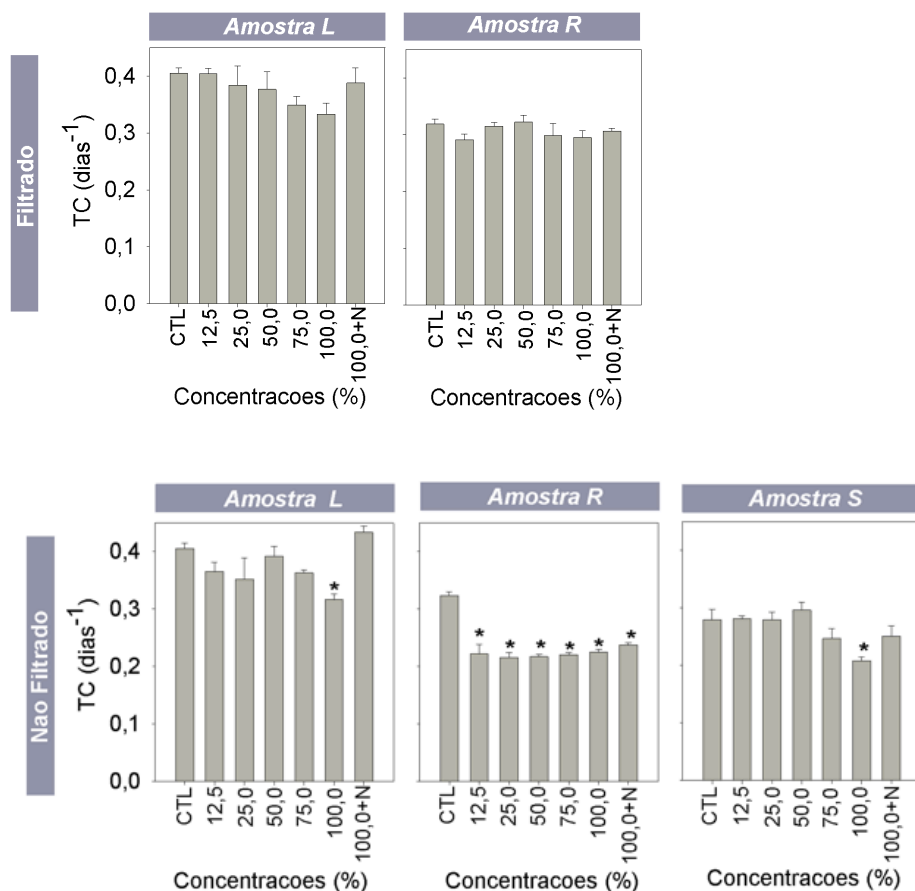


Figura 16-Taxa de crescimento (dias⁻¹) determinada para *L. minor* quando exposta às diferentes amostras no filtrado e no não filtrado. As barras de erro indicam o erro padrão, os asteriscos indicam diferenças significativas entre concentrações e o controlo ($p < 0.05$).

Tabela 9- Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) feita às diferenças na taxa de crescimento (dias⁻¹) de *L. minor* e valores de NOEC e LOEC obtidos.

	Amostras	df	MS _{res}	F _{ratio}	H	p	NOEC	LOEC
Filtrado	L	6	ND*	ND*	7,723	0,259	ND*	ND*
	R	6	0,000445	1,077	0,00267	0,421	ND*	ND*
Não-Filtrado	L	6	0,00441	4,686	0,0264	0,008	75%	100%
	R	6	0,00445	24,468	0,0267	<0,001	ND*	12,5%
	S	6	0,00272	4,604	0,0163	0,009	75%	100%

*ND- não determinado

Tabela 10- Resumo do teste t de student de comparação das taxas de crescimento (dias⁻¹) de *L. minor* entre a concentração de 100% e 100% com adição de nutrientes.

	Amostras	df	t	p
Filtrado	L	4	-1,642	0,176
	R	4	-0,893	<0,423
Não-Filtrado	L	4	-8,514	0,001
	R	4	-2,226	0,090
	S	4	-2,226	0,090

3.2.4 Ensaios com *Daphnia magna*

Os resultados dos bioensaios com a *D. magna* estão ilustrados na Figura 17. Os valores de NOEC e LOEC para a taxa de crescimento diário (TCD) e para a taxa de crescimento intrínseco (r), referentes à toxicidade para a *D. magna*, bem como os respectivos intervalos de confiança de 95% estão indicados na Tabela 11.

A amostra R, para o parâmetro r apresentou um NOEC correspondente à concentração de amostra de 75% e um LOEC correspondente à concentração de amostra de 100%. Na amostra S, para o r , o LOEC foi de 100%.

A taxa de crescimento intrínseco populacional (r) combina fecundidade acumulada e sobrevivência dos indivíduos durante o período de teste, neste caso, ambas as amostras (R e S) mostraram toxicidade para elevadas concentrações da amostra. As diferenças estatísticas foram obtidas na amostra R ($p=0,043$) para a TCD. Além disso, nas amostras S e R foi impossível determinar NOEC e LOEC.

Num estudo efectuado com quatro HAPs: pireno, naftaleno, fenantreno e fluoranteno, tanto individualmente como em misturas, onde foram realizados testes com *D. magna*, utilizando como parâmetro a taxa de crescimento. Foi notado que o pireno e fenantreno causaram diminuição na taxa de crescimento e o naftaleno e fluoranteno não. O que vem a favor dos resultados obtidos, visto que o pireno e o fenantreno são aqueles que se encontram nas amostras analisadas em grandes concentrações, em especial na amostra R.

A estimulação no crescimento a baixas concentrações das amostras pode ser explicada pela presença de partículas nutritivas dissolvidas presentes no meio. Isto sugere que as variações nas amostras devem ser consideradas como um factor complementar para regular testes de toxicidade especialmente quando eles são usados como uma ferramenta na avaliação do risco de ecossistemas. Podem também haver efeitos a longo prazo provenientes de HAPs e outros compostos orgânicos adsorvidos aos sedimentos, que não tenham sido estudados no âmbito da investigação. Não esquecendo que em campo há eventos de chuva no período pós incêndio e existe arrastamento de cinzas para a água e portanto de HAPs. Os HAPs podem ser mascarados pelos nutrientes do meio ou mesmo agregação ou transformação destes.

Comparando a toxicidade das concentrações de 100% filtradas e não filtradas, verificou-se que para ambos os parâmetros estudados não houve diferenças significativas entre elas, sendo assim observados efeitos tóxicos em ambas. Deste modo, mesmo eliminando a componente particulada continuou a haver toxicidade, o que se explica pelos HAPs dissolvidos que foram medidos nas amostras.

Pela Figura 18 pode-se observar que nas concentrações com maior volume de amostra houve maior número de fêmeas mortas. Também é de notar que o filtrado teve maior percentagem de mortalidade em ambas as amostras. Para ambos os casos as mortes aconteceram, geralmente, passado 12 dias de exposição às amostras R e S. Comparando as amostras verificou-se que a amostra R teve maior percentagem de mortes o que se pode dever ao maior nível de HAPs existentes nesta amostra.. Pode-se concluir que a exposição de *D. magna* às amostras teve efeitos letais (mortalidade) com o tempo e efeitos sub-letais, principalmente no numero de neonatos que se reflectiu na taxa de crescimento intrínseco.

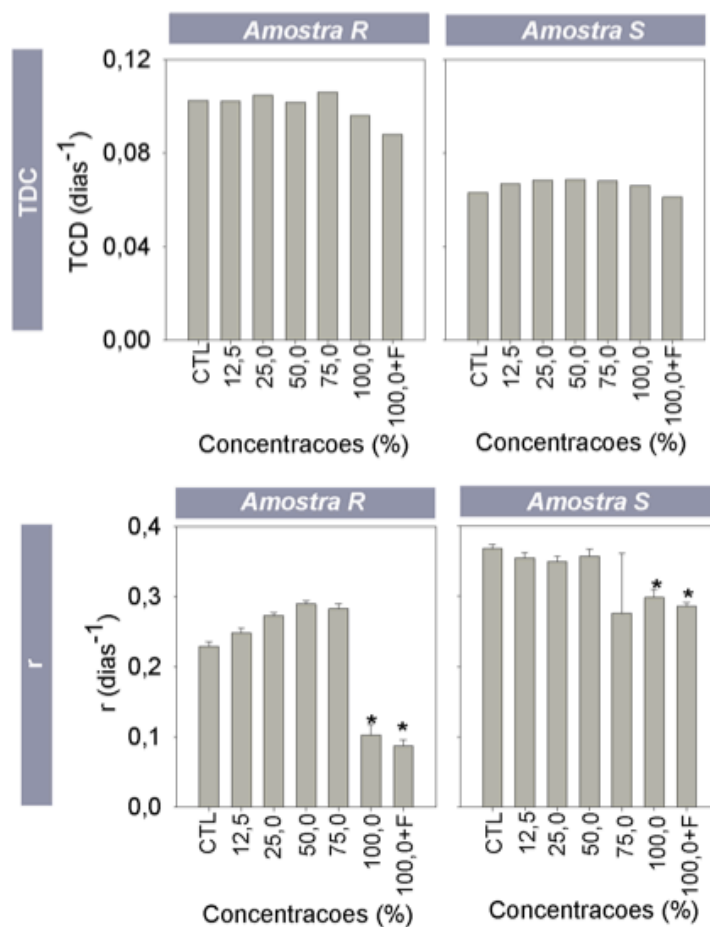


Figura 17- Taxa de crescimento diário, TCD (dias⁻¹) e Taxa de crescimento intrínseco, r (dias⁻¹), determinada para *D. magna* quando exposta às amostras R e S. As barras de erro indicam o erro padrão e os asteriscos indicam diferenças significativas entre as concentrações de cada amostra e o controle ($p < 0.05$).

Tabela 11- Resumo da análise de variância simples (ANOVA unifactorial) e valores de NOEC e LOEC relativos à taxa de crescimento diário (TCD; dias⁻¹) e taxa de crescimento intrínseco (r ; dias⁻¹) de *D. magna*.

	Amostras	df	H	p	NOEC	LOEC
TCD	R	6	34,770	0,043	ND*	ND*
	S	6	10,953	0,530	ND*	ND*
r	R	6	67,539	<0,001	75%	100%
	S	6	64,836	<0,001	75%	100%

*ND- Não determinado

Tabela 12- Resumo do teste de U de Mann Whitney de comparação das taxas de crescimento diário (dias⁻¹) e taxas de crescimento intrínseco (dias⁻¹) de *D. magna* entre a concentração de 100% Filtrada e 100% Não filtrada.

	Amostras	p
TCD	R	0,200
	S	0,233
r	R	0,060
	S	0,241

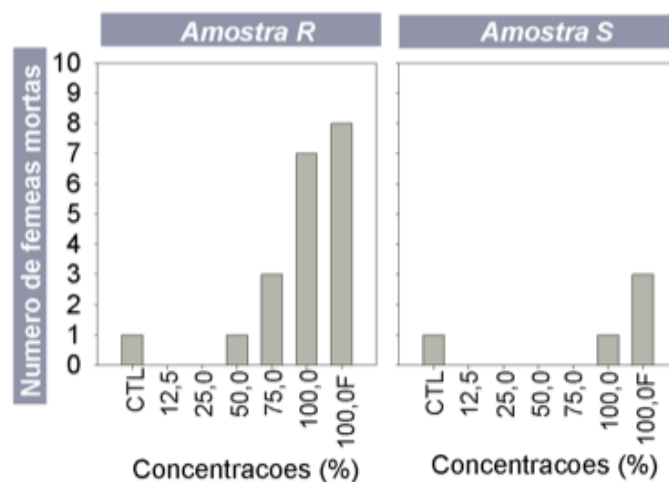


Figura 18- Mortalidade registada nas diferentes concentrações.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou-se como uma avaliação ecotoxicológica efectuada em escorrências superficiais de zonas ardidas, sendo um contributo importante para a avaliação da potencial toxicidade dessas mesmas escorrências.

As encostas (amostra L e amostra R) encontravam-se numa extensa área ardida, com uma vegetação mista. O curso de água (S) ficava entre as duas encostas. Embora próximas entre si e possuíssem características semelhantes (e. g. o mesmo tipo de solo, igual vegetação e igual quantidade de água precipitada), foi observado em campo que a encosta correspondente à amostra L foi afectada por uma maior severidade de incêndio. O estudo foi realizado para as três amostras e foram analisados vários parâmetros (ecotoxicológicos e físico-químicos), sendo estes comparados entre si.

Desta forma o presente estudo permitiu esboçar uma série de conclusões, a saber:

- ◆ Os resultados das análises físico-químicas das amostras R, L e S mostraram que o pH foi inferior a 7, a condutividade foi relativamente baixa e as amostras pouco oxigenadas. Estes resultados contradizem alguns estudos que relatam um aumento do pH durante e após um incêndio, devido a uma troca iónica que induz a alteração deste, resultado de sais minerais de cálcio, potássio, sódio e magnésio que são expelidos após o fogo. Spencer et al. (2003), afirma que com o continuar dos meses de amostragem, os dados mostram uma diminuição nos valores médios da condutividade para uma encosta ardida, obtendo-se uma média de 41 $\mu\text{S}/\text{cm}$, que está de acordo com os resultados do trabalho em causa.
- ◆ Relativamente à presença de nutrientes, os nitratos, a amónia e os sulfatos estiveram abaixo do limite de detecção, o que pode ser explicado pela volatilização devido às altas temperaturas atingidas durante o incêndio .
- ◆ Os resultados mostraram que existem HAPs nas amostras que são formados durante a queima incompleta da vegetação. Os HAPs de baixo e médio peso molecular, como o naftaleno, fenantreno, fluoranteno e pireno foram encontrados em maiores concentrações

na parte particulada. No entanto, devido à sua baixa solubilidade em água seria de esperar que a parte dissolvida tivesse menor concentração destes HAPs.

◆ Relativamente aos resultados obtidos no estudo ecotoxicológico, estes não permitiram, definir um padrão de toxicidade, uma vez que diferentes respostas foram encontradas entre as várias espécies testadas. Foi observada uma diferença clara dos efeitos tóxicos produzidos pelas amostras do escoamento filtrada e não filtrada.

No caso da *V. fischeri* foi possível verificar toxicidade relativa às amostras: Amostra S > Amostra L > Amostra R (da mais tóxica para a menos tóxica). Esta toxicidade pode estar relacionada com compostos inorgânicos, visto que os compostos orgânicos se encontram nas amostras em concentrações muito baixas, fora do limite de detecção do Microtox. No entanto, seria de esperar que os HAPs ficassem mais disponíveis para a bactéria devido à sua baixa solubilidade em água, aumentando assim a toxicidade das amostras (Salizzato et al 1997).

◆ As amostras L e R, ao contrário da amostra S, provocaram efeitos significativos ($p < 0,05$) na taxa de crescimento de *P. subcapitata*, possivelmente devido aos HAPs existentes nestas amostras. As diferenças observadas nas concentrações 100% e 100% mais nutrientes na amostra R indicam que o efeito observado no 100% se deveu à falta de nutrientes na amostra natural

◆ Verificou-se que a espécie *L. minor* foi sensível à amostra R não filtrada, apresentando toxicidade elevada com um LOEC=12,5%. Esta toxicidade demonstrada pode dever-se ao facto da elevada concentração de fluoreno e nitritos. A amostra mais tóxica foi a R seguida da L e S.

◆ O organismo *D. magna* apresentou uma diminuição significativa para a taxa de crescimento intrínseco nas concentrações mais altas, em ambas as amostras. Isto pode dever-se ao facto da contaminação pelos HAPs presentes, entre eles o fenantreno que é um dos HAPs que mostra maior toxicidade, sendo o mais biocumulável nos organismos (Hofman et al 2003). As amostras testadas apresentaram mais efeitos ao nível da taxa de crescimento intrínseco do que na taxa de crescimento diário.

◆ A fracção particulada (não filtrado) apresentou maior toxicidade para *V. fischeri*, *P. subcapitata*, *L. minor*, o que vem ao encontro aos estudos de Lampi et al (2005) que afirma que no caso de sistemas aquáticos os HAPs estão em grande parte associados à componente particulada.

Os resultados ecotoxicológicos obtidos neste estudo, e sumariados nas Tabelas 13 e 14, não apontam para as mesmas conclusões que outros estudos que confirmam a sensibilidade das espécies do seguinte modo: *V. fischeri* > *P. subcapitata* > *L. minor* > *D. magna*, no entanto à que ter em conta que pouco se tem feito ao nível de ensaios ecotoxicológicos com escorrências de incêndios florestais.

Tabela 13- Tabela resumo de resultados para as espécies *V. fischeri*, *P. subcapitata*, *L. minor*, com as amostras L, R e S.

	Amostra L		Amostra R		Amostra S	
	Filtrado	Não Filtrado	Filtrado	Não Filtrado	Filtrado	Não Filtrado
<i>V. fischeri</i>	√(ND)*	√(ND)*	X	√(ND)*	X	√(8%)*
<i>P. subcapitata</i>	√(100%)**	√(100%)**	√(100%)**	√(100%)**	-	X
<i>L. minor</i>	X	√(100%)**	X	√(12,5%)**	-	√(100%)**

√- Foi observado efeito

X- Não foi observado efeito

* - valores de EC₅₀ (15 min)

** - valores de LOEC

Tabela 14- Tabela resumo de resultados para a espécie *D. magna* com as amostras R e S.

	Amostra R	Amostra S
TCD	X	X
r	√(100%)*	√(100%)*

√- Foi observado efeito

X- Não foi observado efeito

* - valores de LOEC

Com este trabalho, foi possível identificar algumas limitações associadas aos dois tipos de análise efectuadas: físico-química e ecotoxicológica. Ao analisar amostras de água naturais tem de se ter em consideração a grande complexidade de interações físico-químicas e a grande diversidade de organismos que habitam nos ecossistemas aquáticos. Essa complexidade torna complicado definir a causa primordial para os efeitos observados. Tendo esta dissertação sido executada num período de 2 meses após o incêndio depois das primeiras chuvas, as análises realizadas, assumem um carácter preliminar, visto que o impacto dos incêndios depende da sua intensidade e duração. Os efeitos a curto prazo também dependem dos eventos de chuva após o incêndio, isto porque é significativa a influência da precipitação na distribuição dos nutrientes e dos diferentes elementos. Como refere Escalé et al (2007) num estudo efectuado na Catalunha, a taxa de eliminação de HAPs também depende essencialmente da intensidade e frequência da precipitação. Como tal, seria igualmente interessante proceder a comparações pós-fogo de amostras do mesmo local, já que como se sabe, os impactes dos fogos florestais nos sistemas aquáticos podem-se sentir dias, meses e até anos após o fogo. A monitorização sazonal físico-química e ecotoxicológica poderá permitir detectar potenciais variações na toxicidade da água associada aos incêndios florestais. Dever-se-á, no futuro, fazer uma análise mais detalhada de outros compostos químicos, entre eles os metais, que podem ser potenciais fontes contaminantes provenientes de incêndios florestais. Sabendo que, existe uma tendência para uma maior concentração de fósforo, potássio, cálcio e magnésio nas camadas superiores dos solos e que a possibilidade de entrarem nas correntes de água após um evento de erosão, provocado pelo fogo, é elevada (Capela 2008).

Em suma, através deste trabalho pretendeu-se fornecer informações válidas sobre a importância dos incêndios florestais como uma fonte de contaminação de sistemas aquáticos e sobre a necessidade de avaliar os seus potenciais efeitos nocivos sobre o biota aquática. Desta forma, e atendendo à série de considerações aqui enunciadas, podemos considerar que este trabalho constitui um ponto de partida para a realização duma série de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

- ISA (2005). Proposta técnica para o plano nacional de defesa da floresta contra incêndios, Instituto superior de Agronomia.
- AFN (2010). Relatório Provisório de Incêndios Florestais, Autoridade Florestal Nacional.
- Abrantes N. J. C. (2007). Análise de Risco Ecológico na Lagoa da Vela. Departamento de Biologia. Universidade de Aveiro. Doutoramento.
- AE (1998). Microtox Manual. A. Environmental. Carlsbad CA, USA, Azur Environmental.
- APHA (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (19.a ed.). Washington, DC: American Public Health Association, American Water works Association, Water Environment Federation.
- ASTM – American Society for Test and Materials. (1980). Standard Practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Reports E. 729-80. Philadelphia, American Standard for Testing and Materials.
- Bisson P.A., Rieman B.E., Luce C, Hessburg P.F., Lee D.C., Kershner J.L., Reeves G.H., Gresswell R.E. (2003). Fire and aquatic ecosystems of the western USA: current Knowledge and key questions. *Forest Ecology and Management* 178 (2003) 213–229
- Cáceres T., Megharaj M., Naidu R. (2008). Toxicity and transformation of fenamiphos and its metabolites by two micro algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlorococcum* sp.
- Camia A., San-Miguel-Ayaz J., Oehler F., Oliveira S.S., Durrant T., Kucera J., Boca R., Whitmore C., Giovando C., Amatulli G., Libertà G., Schmuck G., Schulte E., Bucki M. (2009). Forest Fires in Europe 2008. Joint Research Centre – Institute for Environment and Sustainability.
- Capela J.P.F.A.M. (2008). Efeitos de incêndios sobre a qualidade da água em áreas florestais. Departamento de Ambiente e Ordenamento. Universidade de Aveiro. Mestrado.
- Cassidy J.S.. (2010). Avaliação da qualidade da água do rio Cértima através de ensaios ecotoxicológicos. Departamento de Ambiente e Ordenamento. Universidade de Aveiro. Mestrado.
- Drost W., Matzke M., Backhaus T. (2006). Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere* 67 (2007) 36–43.

Dwire K. A. and Kauffman J. B. (2003). Fire and riparian ecosystems in landscapes of the western USA. *Forest Ecology and Management*. *Forest Ecology and Management* 178 (2003) 61–74

Eom I.C., Rast C, Veber A.M, Vasseur P.. (2007). Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*

EPA (2002). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. (4th edition), U.S. Environmental Protection Agency.

EROSFIRE. The Erosfire Project 2010. Disponível em: <http://www.erosfire.org/>. Acesso em: Setembro 2010.

Ferreira J. P. L., Oliveira M. M., Laranjeira I., Leitão T. E., Quinta-Nova L., Fernandez P., Lopes M. H., Paralta E. A.. (2004). Avaliação do impacto de fogos florestais em recursos Hídricos subterrâneos

GOOGLE. Google maps, 2010. Disponível em: <http://maps.google.pt/>. Acesso em: Novembro 2010.

Hoffman D. J., Rattner B. A., Burton G. A. Jr., Cairns J. Jr.. (2003). *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers.

IM, I.P. Instituto de Meteorologia Portugal, 2008. Disponível em: <https://www.meteo.pt/> . Acesso em: Dezembro 2010.

Lampi M.A.. (2005). Environmental Photoinduced Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Occurrence and Toxicity of Photomodified PAHs and Predictive Modeling of Photoinduced Toxicity. Universidade de Waterloo. Doutorado.

Laranjeira I. e Leitão T. E.. (2008). Avaliação do Impacte de Fogos Florestais nos Recursos Hídricos Subterrâneos. *Análise do Impacte dos Fogos Florestais na Qualidade Química das Águas Superficiais e Subterrâneas das Áreas de Estudo da Região Centro*.

Lemos J. L. S., Oliveira S. D. d., Schlitter L. A. F. S.. (2009). Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPS), propriedades e factores que afectam sua degradação.

Lors C., Perie F., Grand C., Damidot D.. (2009). Benefits of Ecotoxicological Bioassays in the Evaluation of a field biotreatment of PAHs polluted soil. *Global NEST Journal*, Vol 11, No 3, pp 251-259.

Neary D. G., Klopatek C. C., DeBano L. F., Folliott P. F. (1999). Fire effects on belowground sustainability: a review and synthesis. *Forest Ecology and Management* 122 (1999) 51-71

OECD (1998). OECD guidelines for the testing of chemicals, guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test.

OECD (2004). OECD guide lines for testing of chemicals 202 – *Daphnia sp.*, Acute Immobilization test.

OECD (2006). OECD guidelines for the testing of chemicals, guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

OECD (2006). OECD guidelines for the testing of chemicals, guideline 221: *Lemna sp.* Inhibition Test.

Oliveira E.L.C.. (2008). Terrestrial ecotoxicological bioassays to evaluate the effects of chemicals for environmental risk assessment. Departamento de Biologia. Universidade de Aveiro. Mestrado.

Pereira J. L. L. E. (2008). Variações populacionais de cladóceros sujeitos a diferentes condições de stress. Departamento de Biologia. Universidade de Aveiro. Doutoramento.

Pavlic Z., Vidakovic-Cifrek Z., Puntaric D.. (2005). Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema*. Chemosphere 61 (2005) 1061–1068

Richardson M.. (1993). Ecotoxicology Monitoring.

Ruby E. G., Urbanowski M., Campbell J., Dunn A., Faini M., Gunsalus R., Lostroh P., Lupp C., McCann J., Millikan D., Schaefer A., Stabb E., Stevens A., Visick K., Whistler C., Greenberg E. P.. (2004). Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners.

Salizzato M., Pavoni B., Ghirardini A.V., Ghetti P.F.. (1997). Sediment toxicity measured using *Vibrio Fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants. Chemosphere. Vol. 36, No. 14, pp. 2949-2968, 1998

Schafer R. B., Hearn L., Hearn L., Kefford B. J., Mueller J. F., Nuggeoda D.. (2010). Using silicone passive samplers to detect polycyclic aromatic hydrocarbons from wildfires in streams and potential acute effects for invertebrate communities. Water Research. 44 (15): 4590-4600.

Shakesby R. A. e Doerr S. H.. (2006). Wildfire as a hydrological and geomorphological agent. Earth-Science Reviews 74 (2006) 269–307.

Silva A.A.R., Lobo I., Guedes C.L.B., Pinto J.P.. (2006). Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em solos utilizando agitação ultra-sônica, tubo aquecedor/minicondensador e cromatografia gasosa.

Spencer C.N., Gabel K.O., Hauer F.R.. (2003). Wildfire effects on stream food webs and nutrient dynamics in Glacier National Park, USA. Forest Ecology and Management 178 (2003) 141–153.

Thomas A. D., Walsh R. P.D., Shakesby R. A..(1999). Nutrient losses in eroded sediment after fire in eucalyptus and pine forests in the wet Mediterranean environment of northern Portugal. *Catena* 36 (1999) 283–302.

Vieira D. C. S., Keizer J.J., Nunes J.P., Fernandes I.A.C., Faria S.R., Ferreira R.S.V., Pedrosa E.T., Varela M.E.T., Pereira L.M.G.. (2009). Runoff at the micro-plot and slope scale following wildfire, central Portugal.

Vila-Escalé M., Vegas-Vilarrúbia T., Prat N.. (2007). Release of polycyclic aromatic compounds into a Mediterranean creek (Catalonia, NE Spain) after a forest fire. *Water research* 41 (2007) 2171–2179

Yu M.-H. (2001). *Environmental Toxicology- Impacts of Environmental Toxicants on Living Systems*. Lewis Publishers.